



MASTER UNIVERSITARIO EN OPTOMETRIA Y CIENCIAS DE LA VISIÓN

TRABAJO FINAL DE MASTER

HIDROGELES SENSIBLES A ESTÍMULOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS OCULARES.

ROCÍO LÓPEZ PÉREZ

TZANKO TZANOV
DEPARTAMENTO DE INGENIERIA QUIMICA

17/06/2020

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, año 2018-2019. Todos los derechos reservados



MASTER UNIVERSITARIO EN OPTOMETRIA Y CIENCIAS DE LA VISIÓN

HIDROGELES SENSIBLES A ESTÍMULOS PARA LA ADMINISTRACIÓN DE FÁRMACOS OCULARES

RESUMEN

Cada vez más se está incorporando el ácido hialurónico (HA) en optometría, principalmente por su capacidad hidratante. En los últimos años han aparecido en el mercado lágrimas artificiales y soluciones de mantenimiento que incluyen HA, debido a que nos aportan una mayor hidratación en el ojo, disminuyendo así la posibilidad de aparición de ojo seco, o inclusive de incomodidad en el caso de las lentes de contacto (LC).

En nuestro trabajo se prepararon hidrogeles a partir de HA modificado químicamente con compuestos naturales y biocompatibles, los cuales se reticularon con la ayuda de la encima lacasa. Estos compuestos incorporan grupos amino, tioles y fenoles al HA, los cuales, en contacto con la enzima reaccionan y provocan la gelificación y un aumento de la viscosidad para formar el hidrogel. El proceso de gelificación se produce en un único paso, sin la utilización de reactivos químicos y sin generar ningún producto tóxico.

Tras comprobar la biocompatibilidad de los nuevos hidrogeles en células epiteliales, se sometieron a diferentes estímulos como cambios de temperatura, pH y redox, estudiando a su vez las propiedades antioxidantes y la estabilidad, con la finalidad de crear un hidrogel que pueda tener aplicaciones oculares.

Concluimos que estos hidrogeles aparentemente son sensibles a estímulos externos, y según su aplicación final, se podrían optimizar las propiedades físico-químicas y la bioactividad variando el grado de modificación del polímero y las condiciones de reacción.



MASTER UNIVERSITARIO EN OPTOMETRIA Y CIENCIAS DE LA VISIÓN

HIDROGELS SENSIBLES A ESTIMULS PER A L'ADMINISTRACIÓ DE FARMACS OCULARS

RESUM

Cada cop més s'està incorporant el àcid hialurònic (HA) a l'optometria, principalment per la seva capacitat d'hidratació. En els darrers anys han aparegut en el mercat llàgrimes artificials i solucions de manteniment que inclouen HA, degut a la major hidratació que proporciona al ull, reduint així la possibilitat d'aparició d'ull sec, o inclús reduint incomoditats provocades per lents de contacte (LC).

En el nostre treball es van preparar hidrogels a partir del HA modificat químicament amb compostos naturals i biocompatibles, els quals es van reticular amb l'ajuda de l'enzim lacasa. Aquests compostos incorporen grups amino, tiols i fenols al HA, els quals, en contacte amb l'enzim reaccionen i provoquen la gelificació i augment de la viscositat per formar l'hidrogel. El procés de gelificació es produeix en un únic pas, sense la utilització de reactius químics i sense generar cap producte tòxic.

Una vegada comprovada la biocompatibilitat dels nous hidrogels en cèl·lules epitelials, es van sotmetre a diferents estímuls com canvis de temperatura, pH i redox, estudiant a la vegada les propietats antioxidants i l'estabilitat, amb la finalitat de crear un hidrogel que pugui tenir aplicacions oculars.

Concloem que, aquets hidrogels son aparentment sensibles a estímuls externs, i segons la seva aplicació final, es podrien optimitzar les propietats físico-químiques i la bioactivitat modificant el grau de modificació del polímer y les condicions de reacció.



MASTER UNIVERSITARIO EN OPTOMETRIA Y CIENCIAS DE LA VISIÓN

STIMULI RESPONSIVE HYDROGELS FOR OCULAR DRUG DELIVERY

SUMMARY

Hyaluronic acid (HA) have been increasingly incorporated in optometry, mainly due to its moisturizing capacity. Over the last few years artificial tears and maintenance solutions that including HA have appeared on the market, providing greater moisture in the eye, thus decreasing the possibility of dry eye occurrence, or even discomfort in the case of contact lens (LC).

In our work we prepared hydrogels from HA chemically modified with natural and biocompatible compounds, which were crosslinked with the aid of the enzyme laccase. These compounds incorporate amino, thiols and phenols groups to the HA, which in contact with the enzyme react and cause gelation and an increase in the viscosity to form the hydrogel. The gelling process occurs in one step, without the use of chemical reagents and without generating any toxic by-product.

After checking the biocompatibility of the new hydrogels in epithelial cells, they were subjected to various stimuli such as temperature, pH changes and redox, studying in turn their antioxidant properties and stability, in order to create a hydrogel that may have ocular applications.

We conclude that these hydrogels were apparently sensitive to external stimuli, and according to the final application, their physicochemical properties and bioactivity could be optimized varying the degree of modification of the polymer and the reaction conditions.



AGRADECIMIENTOS

Me gustaría agradecer a Tzanko Tzanov por aceptarme para la realización de este trabajo y estar disponible cuando lo he necesitado.

A Silvia Pérez Rafael por enseñarme conceptos de química y laboratorio y permitirme compartir con ella parte de su trabajo. Por su dedicación personal, comprensión, paciencia y tiempo hacia mí en todos los meses que hemos estado realizando este trabajo. Sin ella, no hubiese sido posible realizar todo este trabajo, por todo eso, gracias. Junto a ella, al grupo GBMI por estar dispuestos a ayudarme en los momentos que lo he necesitado.

A Sheila González Vázquez, con la que he compartido horas en el laboratorio y con la cual nos hemos ayudado, apoyado y animado para poder sacar nuestros trabajos adelante. Gracias por estar hasta el último momento.

A mi familia y pareja, por apoyarme en todas las decisiones que he debido tomar desde que inicie la matriculación del máster, por ayudarme durante todos estos meses y ponerme facilidades en las adversidades. En especial, gracias Jordi, por escucharme cada vez que he necesitado desahogarme al llegar a casa, y por hacerme ver que podía seguir adelante, ya que detrás de la tormenta llega la calma.

ÍNDICE

1. Objetivos.....	9
2. Introducción	
2.1. Hidrogeles.....	9
2.2. Uso de hidrogeles en oftalmología.....	11
2.3. Hidrogeles como sistemas de liberación y administración de fármacos.....	12
2.4. Uso del ácido hialurónico (HA) en oftalmología.....	15
3. Metodología y obtención de datos.	
3.1. Material.....	17
3.2. Métodos	
3.2.1. Preparación de soluciones ácidas y básicas.....	19
3.2.2. Preparación soluciones tampón.....	19
3.2.3. Preparación bolsas de diálisis.....	20
3.2.4. Modificación química del ácido hialurónico (HA)	
3.2.4.1. Modificación del HA con ácido dihidrazida (ADH).....	21
3.2.4.2. Caracterización química del HA-ADH.....	23
3.2.4.3. Modificación del HA con tiol (SH)	24
3.2.4.4. Caracterización química del HA-SH.....	25
3.2.4.5. Modificación del HA con dopamina.....	26
3.2.4.6. Caracterización química del HA-DOPA.....	27
3.2.5. Preparación de los hidrogeles de HA mediante la enzima lacasa.....	28
3.2.6. Determinación de la capacidad antioxidante con el reactivo DPPH.....	29

3.2.7. Biocompatibilidad.....	29
3.2.8. Estabilidad de los hidrogeles.....	30
3.2.9. Respuesta de los hidrogeles a diferentes estímulos	
3.2.9.1. pH.....	31
3.2.9.2. Redox.....	32
3.2.9.3. Temperatura.....	32
4. Resultados y discusión	
4.1. Síntesis de HA-ADH, HA-SH y HA-DOPA	
4.1.1. HA-ADH.....	33
4.1.2. HA-SH.....	35
4.1.3. HA-DOPA.....	38
4.2. Preparación de los hidrogeles mediante la enzima lacasa	40
4.3. Capacidad antioxidante con el reactivo DPPH	45
4.4. Biocompatibilidad.....	46
4.5. Estabilidad	48
4.6. Respuesta a diferentes estímulos	
4.6.1. pH.....	50
4.6.2. Redox.....	51
4.6.3. Temperatura.....	53
5. Conclusiones.....	54
6. Bibliografía.....	57
7. Anexos.....	60

1. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es diseñar y preparar enzimáticamente hidrogeles a partir de ácido hialurónico modificado con compuestos naturales, los cuales presentan bioactividades relevantes para su aplicación como plataformas de liberación de fármacos. Se pretende analizar su comportamiento, como plataformas de liberación de fármacos, en respuesta a diferentes estímulos como potencial redox, pH, temperatura o degradación por enzimas.

Para lograr dicho objetivo se establecieron las siguientes tareas:

- Modificación y caracterización química del ácido hialurónico.
- Preparación de hidrogeles mediante la acción de la enzima lacasa.
- Caracterización de las propiedades bioquímicas de los hidrogeles.
- Encapsulación de un compuesto fluorescente y análisis de su perfil de liberación en respuesta a diferentes estímulos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Hidrogeles

Los hidrogeles son materiales de base polimérica hidrófila, cuyas cadenas se encuentran reticuladas por uniones físicas o químicas y mediante las cuales, se forma una red tridimensional.^{1, 2}

Se trata de polímeros, caracterizados por la capacidad que tienen de absorber diferentes fluidos y moléculas de agua³ y no disolverse en sustancias líquidas (gracias a la reticulación de las cadenas poliméricas). La naturaleza hidrófila que tienen los hidrogeles es debido a que, en su estructura, presenta grupos funcionales tales como: –OH, –COOH, –CONH₂– CONH y SO₃H. Estos grupos se hidratan a través de un ambiente acuoso, sin necesidad de la disolución del hidrogel, gracias a la reticulación polimérica. El contenido en agua que obtiene el nuevo material cuando está en agua varía en el rango del 38-80%.⁴

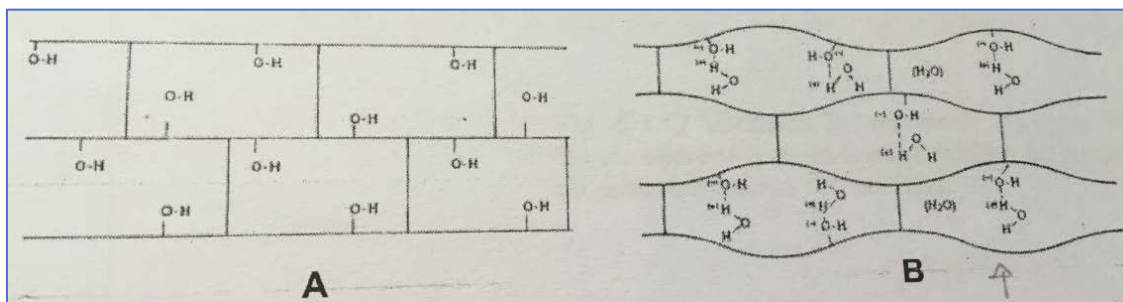


Imagen 1. (A) Hidrogel sin hidratar (B) Hidrogel hidratado.⁴

Los hidrogeles podemos clasificarlos de diversas formas según sus propiedades o características, tal y como podemos ver en la imagen 2. Para nuestro proyecto,



Imagen 2. Clasificación hidrogel.¹

principalmente, nos interesa la clasificación respecto a la sensibilidad de los estímulos externos, ya que a partir de diferentes estímulos externos intentaremos analizar el comportamiento de los hidrogeles. Así pues, si nos centramos en la clasificación de respuesta a estímulos, por una parte existen hidrogeles que son sensibles a

estímulos (o inteligentes)¹ y que, como respuesta a estos estímulos (como pueden ser el pH, la luz, biomoléculas o fuerzas iónicas, entre otras) cambian sus características y propiedades. Por el contrario, existen hidrogeles denominados no sensibles, donde ninguna de sus propiedades se encuentra afectada a los diversos estímulos con los que pueda interactuar el hidrogel.

Como hemos comentado anteriormente los hidrogeles son hidrófilos, y esta hidrofiliabilidad es la causante de que presenten una reducción de la adherencia de proteínas y una alta permeabilidad, características importantes en optometría, y especialmente en lentes de contacto (LC). Bien sabemos, que son muchas las ocasiones en que, si no se hace un buen mantenimiento de la lente de contacto, encontramos gran

cantidad de proteínas adheridas a ellas que en ocasiones pueden dar incomodidad. En personas con lágrima más grasa, también pueden padecer este problema con las LC y deben limpiarlas con soluciones de mantenimiento más eficaces.

Otras características de los hidrogeles son las de ser flexibles, blandos, elásticos, con estructura porosa, biodegradables y biocompatibles, características que, como en el caso anterior, son beneficiosas en usos oftalmológicos.

2.2. Uso de hidrogeles en oftalmología.

Las aplicaciones de los hidrogeles son varias y variadas, entre ellas se encuentran la ingeniería de tejidos, medicina regenerativa, tecnología celular, administración de fármacos e incluso se hace uso de ellos en ámbitos fuera de la biomedicina, como en agricultura, entre otros.⁵

Si nos centramos en el ámbito de la oftalmología, cuando escuchamos la palabra hidrogel rápidamente lo relacionamos con lentes de contacto, puesto que es el uso más generalizado que se hace de ellos. Fue en 1960 cuando Wichterle y Lim comenzaron a pensar en incorporar hidrogeles en LC.¹ Las propiedades que proporciona el hidrogel, hace de la LC un material más blando y flexible, y por lo tanto más cómodo que los materiales usados anteriormente, como son las lentes rígidas. Este avance permitió un mayor confort a los usuarios y por lo tanto, a realizar un uso más prolongado de estas lentes, no únicamente para corrección del defecto refractivo, sino también como plataforma de liberación de fármacos o protección tras cirugía ocular.

Relacionado con las lentes, también se empezó a incorporar el material hidrogel en lentes intraoculares (LIOs). En 1984 se incorporó la primera LIO de silicona y a medida que han ido avanzando los años y se han ido desarrollando nuevos materiales, se han incorporado lentes con materiales acrílicos y de hidrogel.⁶ Las LIOs de hidrogel, de igual manera que las lentes de contacto, aportan mayor flexibilidad, lo que permite poder curvar más las lentes a la hora de realizar operaciones de cataratas. Esto nos permitirá realizar una incisión menor para insertar dicha lente, induciendo así un astigmatismo

menor, que el paciente difiera menores síntomas provocados por la inflamación y por lo tanto, aportando un confort generalizado.

Otra aplicación de estos hidrogeles es en el uso de fármacos oculares, aportando protección a las mucosas frente a fármacos más irritantes, e incluso disminución de RAM (reacciones adversas al medicamento). También ayuda a la adhesión y transporte de nutrientes del fármaco al globo ocular. Este último punto es importante, puesto que los fármacos oculares en muchas ocasiones son eliminados rápidamente a causa del parpadeo y el drenaje de la lágrima, por lo que no realiza el efecto deseado y en ocasiones debemos administrar una dosis mayor por tal de conseguir el efecto deseado.

Por último, relacionado con los fármacos, Vikramadiya Yadav junto a diversos investigadores de la universidad de Columbia Británica (UBC) han desarrollado un hidrogel con nanopartículas el cual contiene ácido cannabigerónico que ayuda a reducir los síntomas del glaucoma.^{7,8} Se ha estudiado en corneas de cerdos, puesto que los ensayos en corneas humanas no es ético, pero han demostrado que al aplicar el hidrogel en el ojo, este crea una capa que se va disolviendo y liberando a su vez las nanopartículas en córnea mientras mantenemos los ojos cerrados (se aplica por la noche por tal de obtener mayor efectividad de absorción).

2.3. Hidrogeles como sistemas de liberación y administración de fármacos.

Como sabemos existen diversas formas de administración de fármacos oculares tales como:

- Vía tópica: tanto en pomadas, soluciones o geles.
- Vía periocular: se trata de una inyección en subconjuntiva, conjuntiva retrobulbar o por la cápsula de Tenon.
- Vía intraocular: inyección con subministro en cámara anterior y vítrea. El uso de esta vía se realiza con mayor frecuencia en cirugías oculares.

La vía de administración más común es la forma tópica. Cuando aplicamos de forma tópica el efecto del fármaco se ve comprometido, puesto que existen barreras y limitaciones que provocan una baja biodisponibilidad del fármaco en las diferentes estructuras oculares. El mecanismo de defensa que tiene el ojo cuando la superficie ocular entra en contacto con el fármaco es de realizar parpadeos excesivos y aumentar el drenaje lagrimal, provocando una absorción del fármaco en una concentración 10 veces menor de su totalidad en los primeros 4-20 minutos.⁹ En otros estudios se han encontrado que el tiempo de residencia de dicho fármaco es incluso menor, de aproximadamente 2-5 minutos y absorbiendo únicamente entre el 1-10% de la dosis total aplicada.¹⁰ El resto de dosis que no es absorbida por la estructura ocular, que en este caso es la mayor parte de la aplicación farmacológica, se drena a través del sistema lagrimal hacia el conducto lagrimonasal. Esto se ha de tener en cuenta, puesto que estamos provocando que el fármaco vaya hacia una estructura no deseada pudiendo provocar efectos secundarios.

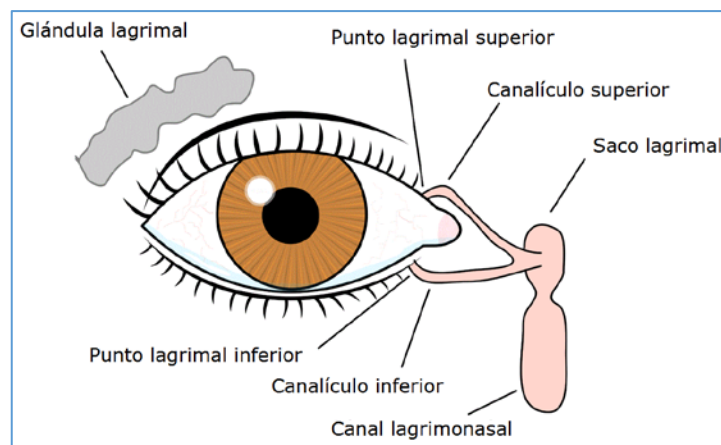


Imagen 3. Vía lagrimal.¹¹

La mayoría de fármacos convencionales encontramos limitaciones tales como:

- La baja biodisponibilidad.
- Riesgo de toxicidades y efectos secundarios debido a la frecuente necesidad de administración.
- Afectaciones nasolagrimales.

Así pues, lo que nos interesa es conseguir que el fármaco esté en contacto con la superficie ocular un tiempo más prolongado.

Los hidrogeles, al tratarse de materiales biocompatibles y con buenas propiedades en el medio acuoso son una buena opción para la liberación controlada de fármacos en sistemas tópicos oculares. Robinson et al. establecieron que la tasa de drenaje del ojo en una solución instilada se reduce notablemente a medida que la viscosidad de la solución incrementa, por lo que cabe esperar, que con un fármaco que contenga estructura de hidrogel el drenaje sea menor que en un fármaco convencional.⁹ A partir de estos fármacos modificados con hidrogeles inteligentes lo que se quiere conseguir es obtener:

- Buena penetración corneal.
- Tiempo de prolongación del fármaco en contacto con la estructura ocular más elevado.
- Menor posibilidad de efectos secundarios.
- Reducción de la irritabilidad (provocando así disminución de la aparición de parpadeo y lagrimeo reflejo).

Lo que obtendremos con esta alternativa de administración de fármacos es una liberación prolongada del fármaco, provocando así que se requiera un menor número de aplicaciones de dicho fármaco y por lo tanto disminuyendo los efectos secundarios provocados por este. Por otro lado, existe inconvenientes de estos hidrogeles ya que, al tratarse de materiales viscosos, la aplicación del fármaco puede provocar una visión borrosa (como cuando ponemos pomada tópica ocular) y sensación de cuerpo extraño provocando en ocasiones lagrimeo y exceso de parpadeo. Estos inconvenientes, como podemos observar, resultan ser de menor significación, ya que los efectos no son duraderos, se puede solucionar aplicando el fármaco nocturnamente y los beneficios son mayores a los inconvenientes que pueda ocasionar.

Citar que, las lentes de contacto blandas, al tratarse de material formado por hidrogeles, son usadas como sistema de liberación del fármaco. Desde 1965 por Sedlacek, J fue propuesta la lente de contacto como sistema de liberación de fármacos, abalando estudios a lo largo de los años donde se demuestra la eficacia obtenida con este método.¹⁰ Se realiza una inmersión en la solución de fármaco actuando así como reservorio de este y obteniendo un tiempo de prolongación en contacto con la superficie ocular más elevado, provocando a su vez menor discomfort por parte del paciente y menores alteraciones en la visión a comparación del fármaco con hidrogel administrado directamente.

2.4. Uso del ácido hialurónico (HA) en oftalmología.

El HA fue descubierto en 1934 por Karl Meyer y John Palmer¹² en el humor vítreo de los bovinos, pero lo encontramos en diferentes estructuras del cuerpo humano (tanto a nivel intracelular como extracelular) como son: la piel, matriz pericelular, el cordón umbilical, fluido sinovial de las articulaciones, cartílagos y humor vítreo, siendo abundante en tejidos conectivos, nerviosos y epiteliales.^{1, 13,14}

En 1950 se estudió la estructura molecular del HA y se encontró que se trata de un polímero lineal compuesto por uniones disacáridas de ácido D-glucurónico y N-acetil- D glucosamina unidos por enlaces $\beta 1-3$ y $\beta 1-3$.^{1, 13,14} Dentro de esta estructura podemos encontrar diferentes grupos funcionales como el ácido carboxílico ($-\text{CO}_2\text{H}$), grupo amino ($-\text{NH}$) y grupos hidroxilos primarios y secundarios ($-\text{OH}$).

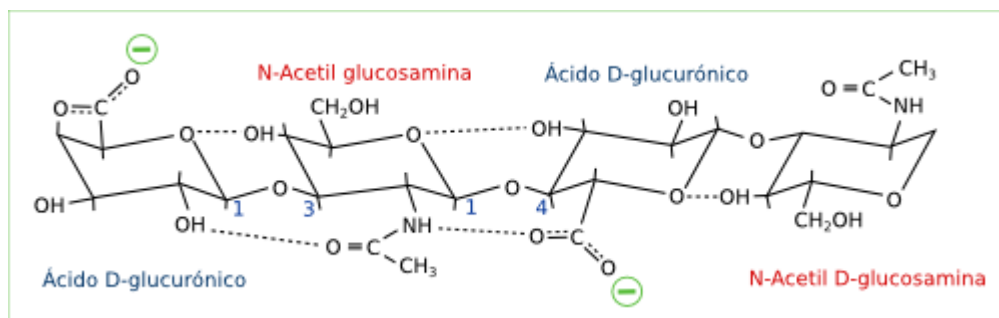


Imagen 4. Estructura HA.¹³

Esta estructura puede verse modificada por tal de obtener diferentes propiedades físico-químicas, las cuales pueden alterarse según la concentración de HA que tenemos. Por ejemplo, para obtener una mayor viscosidad del material (que es una de las características más importantes del HA), requerimos de una mayor concentración puesto que existe una reticulación mayor de las cadenas y por lo tanto mayor viscosidad. La temperatura, o el pH son otros de los factores que pueden influir en las propiedades de este material, provocando pérdida de la cantidad de solución, pérdida de viscosidad o estructuras moleculares más flexibles.

A finales 1950 se realizó la primera aplicación biomédica del HA, donde se substituyó el humor vítreo por el HA. Al inicio se usaba extrayéndolo del cordón umbilical o de crestas de gallo, pero en 1988 se empezaron a extraer de bacterias *Streptococcus* obteniendo así mayor cantidad de HA.¹⁴ En la actualidad podemos obtenerlo de tejidos animales o por fermentación microbiana usando cepas bacterianas, obteniendo HA con diferentes pesos moleculares y purezas.

El HA es un material biocompatible y biodegradable, hidrofílico y viscolástico (como hemos visto anteriormente). A causa de estas propiedades es utilizado en gran medida en diversos campos como el de biomedicina e industria, dermatología (por la capacidad hidratante y regeneradora), oncología (como vehículo de administración de fármacos), osteoartritis, ingeniería de tejidos (para ayudar a la regeneración de huesos y cartílagos) y oftalmología, entre otras.

En oftalmología cada vez más se usa el HA para diferentes tratamientos o cirugías gracias a las propiedades que hemos comentado anteriormente. Algunos de los casos en que podemos hacer uso del HA son:

- Reemplazo del humor vítreo.
- Lentes de contacto y soluciones de mantenimiento.
- Lágrimas artificiales.
- Protector de córnea en cirugías oftalmológicas.

- Liberación de fármacos.

También comentar que aparte del uso que podemos hacer del HA, el propio HA que podemos encontrar en estructuras de nuestro cuerpo, nos proporciona beneficios tales como:

- Distribución de agua a diferentes tejidos conectivos como el estroma corneal.
- Mayor viscosidad a la lágrima, puesto que se ha demostrado que existe presencia del HA en lágrima humana.
- Proporciona viscosidad al humor vítreo.
- Mantenimiento del epitelio corneal hidratado.

3. METODOLOGÍA Y OBTENCIÓN DE DATOS.

3.1. Material

A parte de los reactivos y sustancias requeridas para la síntesis y caracterización del hidrogel y sus propiedades, necesitamos instrumentos y materiales propios del laboratorio. Algunos de ellos se recogen en la siguiente tabla.

Tabla 1. Instrumentación y material del laboratorio.

INSTRUMENTACIÓN	MATERIAL
Bascula Precisa 80 A-200M Wiss quality	Eppendorf
Ultracentrifuga Allegra X-15R centrifuge Beckman coulter	Falcons
Liofilizador Telstar Crydox	Probetas
Incubadora agitadora Ivymen system	Jeringuillas
Incubadora con agitación Certomat BS-T sartorius stedim biotech	Pinzas y espátulas
pH-metro pH211 Hanna instruments	Pipetas y pistola de dosificación
Agua milli-Q a partir de Direct-Q Millipore	Agua destilada
Congelador cold fast 500U (-80º)	Vaso de precipitados
Agitador magnético Cimarec y poly Thermo Scientific	Placas para espectrofotómetro
Agitador magnético IKA RTC basic	Garrafas 5L

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, año 2018-2019. Todos los derechos reservados

Espectrofotómetro de lector de placas Infinite M200 Tecan	Barras magnéticas
Incubadora Nuaire™ CO ₂ Water-Jacketed	Guantes y bata

En la tabla 2 podemos encontrar los diferentes reactivos que se han utilizado en el trabajo

Tabla 2. Reactivos.

REACTIVOS	FORMULA QUÍMICA	ABREVIATURA
Hidróxido de sodio	NaOH	
Ácido clorídrico	HCl	
Ácido acético	CH ₃ COOH	
Acetato de sodio	C ₂ H ₃ NaO ₂	
Ácido etilendiaminotetraacético	C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈	EDTA
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	
Azida de sodio	NaN ₃	
Ácido adípico dihidrazida	C ₆ H ₁₄ N ₄ O ₂	ADH
1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida - HCl	C ₈ H ₁₇ N ₃	EDC
Etanol	C ₂ H ₅ OH	
Phosphate bufferes saline tablets		
Fluorescamina	C ₁₇ H ₁₀ O ₄	
Dimetilsulfóxido	C ₂ H ₆ OS	DMSO
Fosfato disódico	Na ₂ HPO ₄	
Bifosfato de sodio	NaH ₂ PO ₄	
2-Iminotiolano	C ₄ H ₇ NS	Traut reagent
L-Cisteína	C ₃ H ₇ NO ₂ S	Cys
Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico)	C ₈ H ₁₁ NO ₂	Reactivo Ellman
4-(2-aminoethyl)benzene-1,2-diol	CH ₅ NO ₃	Dopamina
Ácido 2-etanosulfónico	C ₆ H ₁₃ NO ₄ S	MES
N-hydroxysuccinimide	C ₄ H ₅ NO ₃	NHS
Carbonato de sodio	Na ₂ CO ₃	
Folin-Ciocalteu		FCR
2,2-difenil-1-picrilhidrazilo	C ₁₈ H ₁₂ N ₅ O ₆	DPPH
Metanol	CH ₃ OH	
Fosfato monopotásico	KH ₂ PO ₄	

Fosfato dipotasico	K_2HPO_4	
Guaiacol	$C_7H_8O_2$	
Peróxido de hidrógeno	H_2O_2	
Isotiocinato de fluoresceína	$C_{12}H_{11}NO_5S$	Fluoresceína
Ácido bórico	H_3BO_3	
Ácido fosfórico	H_3PO_4	
Ditiotreitol	$C_4H_{10}O_2S_2$	DTT

3.2. Métodos

3.2.1. Preparaciones de soluciones ácidas y básicas

Previamente a la preparación de hidrogeles realizamos diferentes soluciones ácidas y básicas necesarias para diferentes procesos.

Preparamos soluciones de NaOH y HCl a diversas concentraciones a partir de una solución stock comercial de NaOH 5M y HCl 12M. Los cálculos realizados los podemos ver a continuación:

Para 40ml de NaOH:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \rightarrow 40 \cdot 1 = 5 \cdot V_2 \rightarrow V_2 = 8 \text{ ml (32 ml gua)}$$

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \rightarrow 40 \cdot 0.5 = 5 \cdot V_2 \rightarrow V_2 = 4 \text{ ml (36 ml agua)}$$

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \rightarrow 40 \cdot 0.1 = 5 \cdot V_2 \rightarrow V_2 = 0.8 \text{ ml (39.2 ml agua)}$$

Para 40ml de HCl:

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \rightarrow 40 \cdot 5 = 12 \cdot V_2 \rightarrow V_2 = 16.66 \text{ ml (23.33 ml gua)}$$

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \rightarrow 40 \cdot 1 = 12 \cdot V_2 \rightarrow V_2 = 3.33 \text{ ml (36.66 ml gua)}$$

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \rightarrow 40 \cdot 0.5 = 12 \cdot V_2 \rightarrow V_2 = 1.66 \text{ ml (38.33 ml agua)}$$

$$V_1 \cdot C_1 = V_2 \cdot C_2 \rightarrow 40 \cdot 0.1 = 12 \cdot V_2 \rightarrow V_2 = 0.33 \text{ ml (39.67 ml agua)}$$

3.2.2. Preparación soluciones tampón

Para la disolución del HA y la purificación de los polímeros sintetizados mediante diálisis, utilizamos solución tampón de acetato 100mM pH 5.5.

Por tal de realizar esta preparación añadimos en 1l de agua milli-Q (agua ultrapura), 0.845ml CH_3COOH y 8.2g $C_2H_3NaO_2$. Finalmente comprobamos y ajustamos el pH con las soluciones ácidas y básicas.

Realizamos solución tampón de PBS (fosfato salino) a pH 7.4 añadiendo en 200ml de agua milli-Q una pastilla de tableta salina tamponada con fosfato y ajustamos el pH.

Para diferentes procesos realizamos soluciones tampón de PB (fosfato) a diferentes pH tal como vemos a continuación.

- pH 8: disolvimos Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 en 100 ml de agua milli-Q y ajustamos el pH.

$$100\text{ml} \cdot \frac{1\text{l}}{1000\text{ml}} \cdot \frac{0.0932\text{mol}}{1\text{l}} \cdot \frac{141.96\text{g}}{1\text{mol}} = 1.323\text{g Na}_2\text{HPO}_4$$

$$100\text{ml} \cdot \frac{1\text{l}}{1000\text{ml}} \cdot \frac{6.8 \cdot 10^{-3}\text{mol}}{1\text{l}} \cdot \frac{156.01\text{g}}{1\text{mol}} = 0.106\text{g NaH}_2\text{PO}_4$$

- pH 6.5: añadimos en 1l de agua milli-Q 4.75g KH_2PO_4 y 2.625g K_2HPO_4 y ajustamos a pH 6.5.

Finalmente, realizamos la solución tampón MES añadiendo 24.4145g de MES a 250ml de agua milli-Q y ajustándolo a pH 5.5.

$$250\text{ml} \cdot \frac{1\text{l}}{1000\text{ml}} \cdot \frac{0.5\text{mol}}{1\text{l}} \cdot \frac{195.2\text{g}}{1\text{mol}} = 24.405\text{g MES}$$

3.2.3. Preparación bolsas de diálisis

Para poder purificar mediante diálisis los diferentes lotes de HA modificado utilizamos membranas de celulosa comerciales con un MWCO (molecular weight cutt-off) de 13kDa. Previamente a su uso realizamos el siguiente tratamiento:

- Cortamos las membranas y las pusimos en agua destilada para lavarlas.
- Calentamos 1.5l de agua milli-Q a 80°C con agitación y se añadió EDTA y NaHCO_3 . Añadimos las membranas ya lavadas y dejamos durante 30'.
- Sacamos, limpiamos y guardamos las membranas (storage: en nevera con solución 0.5% NaN_3).

La utilización de estas membranas permite el intercambio de moléculas (menores a 13kDa) entre el polímero que introducimos en la bolsa de diálisis y la solución de dicha diálisis. De esta manera, mediante cambios de agua de la diálisis conseguimos eliminar

los reactivos que no han reaccionado en el proceso de modificación del HA, obteniendo así un polímero más puro.

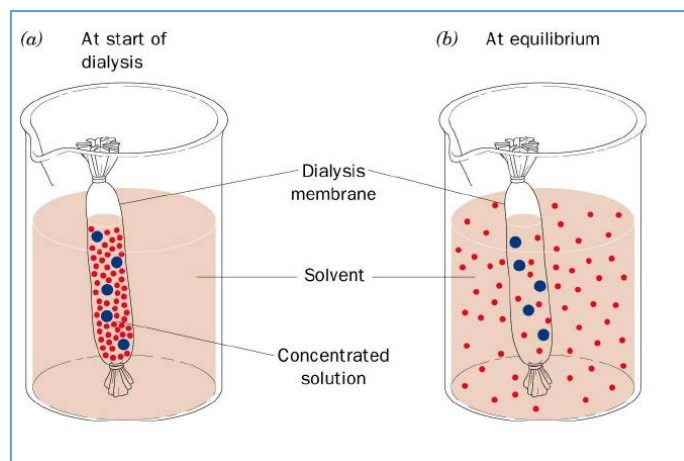


Imagen 5. Proceso de diálisis.

3.2.4. Modificación química del ácido hialurónico (HA)

Para la preparación de los hidrogeles utilizamos ácido hialurónico modificado químicamente dónde se introducen grupos amino ($-NH_2$), grupos tiol ($-SH$) y fenoles en su cadena de polisacárido y que participan en la reacción de viscosidad.

3.2.4.1. Modificación del HA con ácido adípico dihidrazida (ADH)

Preparamos HA modificado siguiendo la síntesis química descrita en el artículo "*Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hydrogels*".¹⁵ La modificación química lo realizamos en dos pasos, donde obtuvimos, por una parte el HA modificado con ADH, el cual denominaremos HA-ADH y en el siguiente paso introdujimos el grupo tiol (SH), obteniendo así el HA-SH.

Para el primer paso partimos de 1g de HA (200 kDa) a concentración 5%. Esta cantidad es diferente a la descrita en el artículo, por lo que realizamos los cálculos necesarios por tal de obtener las proporciones correctas de los reactivos y de las diferentes condiciones experimentales. Dichos cálculos los podemos ver a continuación:

$$1g \cdot \frac{1000 \text{ mg}}{1g} \cdot \frac{1ml}{5mg} = 200ml \text{ agua milli} - Q$$

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

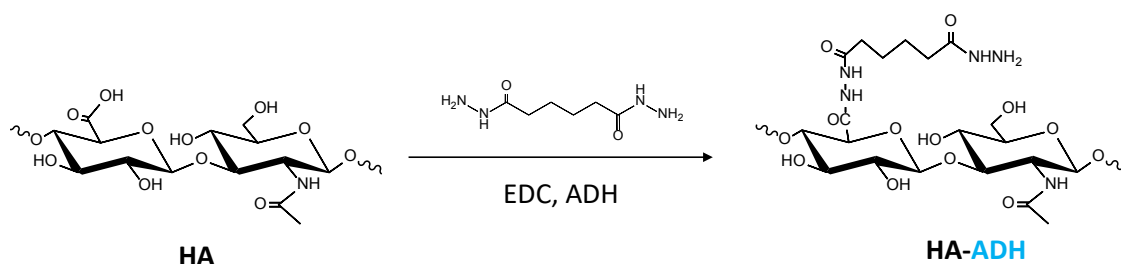
© Universitat Politècnica de Catalunya, año 2018-2019. Todos los derechos reservados

$$\frac{60 \text{ mg HA}}{1100 \text{ mg ADH}} = \frac{100 \text{ mg HA}}{?} \rightarrow ? = 18333 \text{ mg ADH} \rightarrow 18.33 \text{ g ADH}$$

$$\frac{0.06 \text{ g HA}}{0.1 \text{ g EDC}} = \frac{1 \text{ g HA}}{?} \rightarrow ? = 1.66 \text{ g EDC}$$

Añadimos el HA en agua milli-Q, lo mezclamos hasta su total disolución y añadimos 18.3288g ADH. Tras pasar 30' de agitación de la solución anterior comprobamos el pH y lo ajustamos a 4.8. Seguidamente añadimos 1.6854g EDC y fuimos controlando el pH cada 10' durante 2h, pasadas estas 2h subimos el pH a 7 para parar la reacción.

El reactivo EDC sirve para activar los grupos carboxílicos (-COOH) presentes en la cadena del HA que reaccionan con los grupos amino (-NH₂) presentes en el ADH. De esta forma obtenemos el HA acoplado al ADH (el cual pierde un grupo amino) a partir de los grupos carboxílicos tal y como podemos ver en el siguiente esquema:



Esquema 1. Modificación del HA con ADH.

Para la purificación del polímero pusimos la solución en una membrana de celulosa, la cual introdujimos en una garrafa con agua milli-Q y etanol (25%), y lo dejamos agitando en cámara frigorífica durante toda la noche. Realizamos la diálisis durante 24h realizando 2-3 cambios de agua destilada, con la finalidad de que se realizase de forma correcta (lo que se consigue con la diálisis son cambios externo/interno de aquellas partículas que no han reaccionado).



Imagen 6. HA-ADH después de su liofilización.

Una vez realizada la diálisis, pusimos a congelar la preparación de HA-ADH a -80°C entre 12-24h. Una vez la muestra estuvo congelada se liofilizo durante tres días, para obtener el polímero puro, deshidratado y de aspecto algodonoso, tal como podemos ver en la imagen 6.

Comprobamos de forma visual la completa eliminación del agua del polímero después del proceso de liofilización, dejando la muestra a temperatura ambiente durante unos minutos. Si no se observa ningún cambio en el material de aspecto tipo algodón se considera que la liofilización ha

sido correcta, por lo que guardamos en un flasco de vidrio donde añadimos nitrógeno (gas) y guardamos a -4°C .

Del proceso de modificación química de la estructura del HA, obtuvimos 0.7658g de HA-ADH, del cual 0.5g reservamos para realizar la modificación con SH y el resto lo usamos para su caracterización.

3.2.4.2. Caracterización química del HA-ADH

Para la caracterización del HA-ADH se utilizaron métodos colorimétricos y espectroscópicos.

Como método colorimétrico, utilizamos la fluorescamina siguiendo el protocolo *NanoDrop 3300 Fluorescamine Protein Assay Thermo Scientific*¹⁶ para determinar las aminas primarias de las proteínas. La fluorescamina es un reactivo químico que en presencia de aminas, reacciona dando una coloración amarillenta permitiendo así medir la absorbancia a longitudes de onda 390nm y 365nm con el espectrofotómetro.

Pesamos las cantidades necesarias de HA-ADH para concentración 1%, 0.75% y 0.5% y para HA no modificado concentración 0.5% y 0.75% (que se usaron como control). Los pesos totales de las muestras lo podemos ver en anexos.

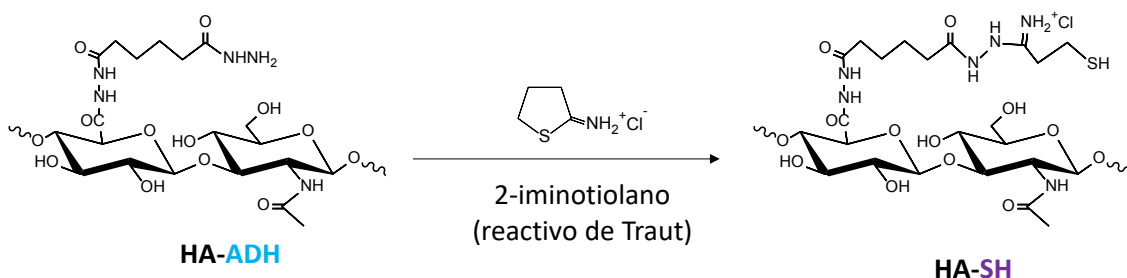
Preparamos las muestras de HA y HA-ADH a diferentes concentraciones en solución tampón PBS pH 7.2 y dejamos mezclando hasta su total disolución.

Preparamos una disolución de fluorescamina en DMSO, añadiendo 3mg de fluorescamina a 1ml de DMSO. Para la recta de calibrado, utilizamos una solución de ADH en 5ml de solución tampón para hacer la recta de calibrado.

En una placa de pocillos negra (microtituladora), tal como indica el protocolo¹⁶, añadimos 300 µl de solución de ADH en el primer pozo y realizamos una serie de diluciones. Pusimos nuestras muestras en los diferentes pozos (la disposición de cada uno de los pozos lo podemos ver en anexos) y añadimos rápidamente 50µl de fluorescamina a cada pozo y realizamos la medida de longitud de onda de excitación a 365nm y 390nm.

3.2.4.3. Modificación del HA con SH

Como hemos comentado anteriormente, a partir del HA-ADH realizamos la modificación para los grupos tiol (SH) según el artículo citado anteriormente¹⁵. En este caso se introduce reactivo Traut, el cual reacciona con los grupos aminos libres del HA-ADH, acoplándose a ellos y aportando un grupo –SH, tal y como podemos ver en el esquema 2.



Esquema 2. Modificación del HA-ADH con Traut.

Para obtener nuestro HA-SH modificamos las cantidades necesarias teniendo en cuenta, que partimos de 0.50298g de HA-ADH.

$$\begin{aligned}
 \frac{100\text{mg HA-ADH}}{38.5\text{ mg Traut's}} &= \frac{502.9\text{mg HA-ADH}}{x\text{ Traut's}} \rightarrow x = 193.61\text{ mg Traut} \\
 \frac{100\text{mg HA-ADH}}{0.5\text{ ml PB}} &= \frac{502.9\text{mg HA-ADH}}{x\text{ PB}} \rightarrow x = 2.51\text{ ml solución tampón PB}
 \end{aligned}$$

$$\frac{100\text{mg HA-ADH}}{4.5\text{ml agua milli-Q}} = \frac{502.9\text{mg HA-ADH}}{x \text{ agua milli-Q}} \rightarrow x = 22.63 \text{ ml agua milli-Q}$$

Pusimos a disolver el HA-ADH en agua milli-Q durante 1h y seguidamente añadimos 2ml de la solución tampón PB pH8 (reservando 0.51ml para más adelante). Una vez disuelto añadimos la solución del reactivo Traut junto a los 0.51ml de solución tampón que habíamos reservado, añadimos nitrógeno (gas) a la solución y dejamos durante 2h en el agitador magnético a pH 8. Tras estas 2h pusimos la solución a realizar diálisis en agua milli-Q y solución tampón de acetato pH 5.5 durante un día. Pusimos nitrógeno (gas) a la botella de diálisis para prevenir, junto con la solución tampón, la oxidación de los grupos tiol. Tras tener dializada nuestra solución la pusimos a congelar a -80°C y la liofilizamos durante 3 días. Tras comprobar que la liofilización era correcta guardamos en un flasco de vidrio, añadiendo nitrógeno (gas) y guardamos a -4°C.

3.2.4.4. Caracterización química del HA-SH

Para realizar la caracterización del HA-SH seguimos el protocolo *Ellman's Reagent*.¹⁷ El reactivo de Ellman es un compuesto que al reaccionar con los grupos SH libres da una coloración que permite cuantificar la absorbancia a longitudes de onda 412nm y 450nm. Realizamos las soluciones necesarias para el experimento, como son la solución de L-cisteína y de Ellman.

La L-cisteína es un aminoácido que contiene un grupo SH y que nos sirvió para realizar la recta de calibrado. Para la solución de L-cisteína, pesamos 0.1232g de L-cisteína, y añadimos a 10ml de solución tampón PB pH 8. Para la solución del reactivo Ellman añadimos 0.0032g de reactivo en 10 ml de solución tampón.

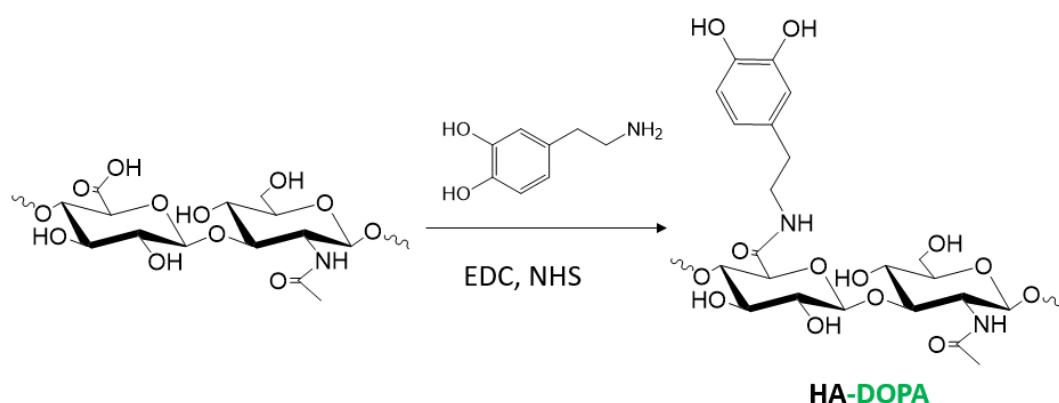
Pesamos el HA-SH para concentraciones 1% y 0.75% (150 µl) y 0.5% (300 µl) (los pesos lo podemos ver en anexos). Le añadimos el volumen correspondiente de solución tampón PB y cuando estuvieron disueltos añadimos 100 µl de solución Ellman.

Seguidamente realizamos la medida de la absorbancia a las longitudes de onda comentadas anteriormente, en este caso en una placa transparente. En el primer pozo pusimos 200 µl de L-Cisteína, en la dilución en serie 100 µl de solución tampón, y se

añadió 100 µl de Ellman en todos los pozos. De nuestras muestras, con el Ellman previamente introducido se añadió 200 µl en los pozos correspondientes.

3.2.4.5. Modificación del HA con dopamina

Para realizar la modificación del HA con dopamina, el cual denominamos HA-DOPA partimos del artículo *“Optimal conjugation of catechol group onto hyaluronic acid in coronary stent substrate coating for the prevention of restenosis.”*¹⁸ Como en el caso de la modificación con ADH, la reacción se lleva a cabo entre los grupos carboxilos del HA (activados con el reactivo EDC) y con los grupos amino libres de la dopamina, tal y como podemos ver en el esquema 3.



Esquema 3. Modificación HA con dopamina.

Como quisimos realizar el experimento para 1g de HA usamos el doble de cantidad de reactivos de los que pone el artículo citado anteriormente.

Cogimos 150ml de solución tampón y le añadimos el gramo de HA dejándolo en el agitador magnético hasta su disolución. Cada 15' fuimos añadiendo NHS y EDC a esta preparación hasta tener la totalidad de gramos incorporados (0.3523g y 0.5727g respectivamente). En este momento incluimos los 0.3857g de dopamina de golpe y esperamos 4h a que se disolviese. Seguidamente pusimos a hacer diálisis (con agua destilada y solución tampón acetato). Ajustamos a pH 5.5 la botella de diálisis, añadimos nitrógeno y la dejamos un día realizando diálisis. Tras sacar la solución de la membrana

congelamos a -80°C y una vez listas liofilizamos durante 3 días. Pasados estos días recogimos en un flasco de vidrio, añadimos nitrógeno y guardamos a -4°C .

3.2.4.6. Caracterización química de HA-DOPA

Realizamos la caracterización de los grupos fenol ($-\text{OH}$) descrita en el artículo anterior ¹¹. Se utiliza el reactivo Folin-Ciocalteu para determinar colimétricamente la cantidad de grupos fenol existentes en la cadena de HA. El reactivo Folin-Ciocalteu reacciona con los grupos fenol cambiando a un color negro-azulado.

Para realizar las soluciones necesarias, por una parte pesamos 10,0530 g Na_2CO_3 20% y lo añadimos a 50 ml de agua milli-Q. Preparamos la solución de Folin-Ciocalteu con 1ml de Folin-Ciocalteu (2N) en 9 ml de agua milli-Q obteniendo una concentración 0.2N de Folin-Ciocalteu. Por último pesamos 0.0120g de dopamina en 10ml de agua milli-Q.

Por otra parte pesamos el HA-DOPA a concentración 0.1% en 3ml y 0.05% en 4ml y realizamos dos réplicas de cada uno de ellos y del HA no modificado (los pesos reales los encontramos en anexos). A cada una de las réplicas le añadimos el volumen de agua milli-Q correspondiente, pusimos nitrógeno y dejamos mezclando. Una vez disueltos añadimos 200 μl de la muestra junto a 200 μl de la solución de Na_2CO_3 y otros 200 μl de la solución de Folin-Ciocalteu.

Para hacer la medida de la absorbancia a 700nm y 765nm usamos una placa transparente, donde en el primer pozo pusimos 100 μl de la solución de dopamina y seguidamente hicimos la dilución en serie. Una vez realizada la dilución en serie añadimos 50 μl de la solución de Na_2CO_3 y otros 50 μl de la solución de Folin-Ciocalteu en cada uno de los pozos. Los otros pozos los rellenaremos con 200 μl de nuestras muestras, que como hemos comentado anteriormente ya tenían añadidos las diferentes soluciones (en anexos podemos ver la disposición de la placa).

3.2.5. Preparación de los hidrogeles de HA mediante la enzima lacasa

Para la creación de los hidrogeles partimos del HA-SH, HA-DOPA y HA no modificado, poniendo los gramos correspondientes en 3ml de solución tampón acetato pH 5.5. Como hicimos estos hidrogeles a concentración 1% requerimos 0.03g de cada uno de los HA (modificados y no modificado). Pusimos el HA junto a la solución tampón y dejamos agitando hasta su total disolución. En el caso del HA-SH realizaremos el mismo proceso para diferentes volúmenes (1.5ml, 3ml y 6ml).

Realizamos la solución de lacasa a partir de 0.1g de denilite II base, en 5ml de agua milli-Q, mezclamos con vortex durante 10' y pusimos a precipitar durante 5' a 4000 rpm. Tras la precipitación nos quedamos el líquido, que contiene la enzima lacasa, la cual pusimos en diferentes pozos junto a los HA citados anteriormente, tal como se puede ver en la imagen 7.

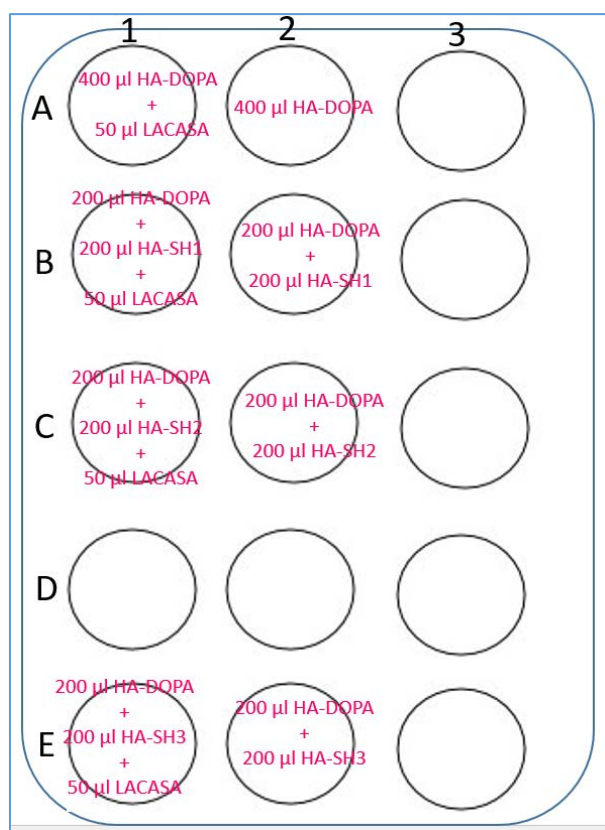


Imagen 7. Distribución placa.

Tras incorporar la lacasa mezclamos bien con la ayuda de una pipeta para aportar oxígeno, provocando así que la enzima reaccionase. Esta enzima nos aportará una reacción de oxigenación y proporciona viscosidad, por lo que nuestras muestras que son líquidas deberían quedar más gelificadas gracias a la acción de la lacasa.

Cuando tuvimos llenos los pozos correspondientes pusimos la placa a incubar durante 2h a 37°C con agitación.

3.2.6. *Determinación de la capacidad antioxidante con el reactivo DPPH*

Para poder determinar la capacidad antioxidante de nuestros hidrogeles, realizamos el experimento con el compuesto DPPH para determinar su capacidad de eliminar o capturar los radicales libres.

Para realizar este experimento tuvimos que hacer todo a oscuras, por tal de que la solución no se viese afectada. Primero hicimos la solución de DPPH a partir de 0.0020g de DPPH en 8ml de metanol. Añadimos 500 µl de la solución en nuestras muestras de hidrogeles 30 mg y dejamos reposando durante 30' (cubiertos con papel de plata para que no les entrase luz). Tras pasar este tiempo, pusimos 100 µl de cada una de las muestras en una placa transparente y tomamos la medida de la absorbancia a 570nm. Esta misma medida la realizamos a las 2h y a las 24h (en todo momento las muestras junto a la solución estuvieron tapadas a oscuras).

3.2.7. *Biocompatibilidad*

Para comprobar la toxicidad de nuestros hidrogeles, los incorporamos en dos tipos de células epiteliales (fibroblastos y HACAT). El primer paso fue incorporar 100µl de medio con 50000 células en cada pocillo (placa negra de 96 pozos) y dejamos durante 24h para que estas células se adhirieran al fondo. Pasadas estas 24h procedimos a su tratamiento con hidrogeles.

Como hemos comentado anteriormente, las células se encontraban en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose, que se trata de medio líquido el cual las mantiene vivas, por lo que, lo primero que hicimos tras pasar las 24h, fue

absorber el medio de todos los pozos y volvimos a incorporar medio nuevo. Incorporamos los diferentes hidrogeles, en los pozos correspondientes tal como podemos observar en la imagen 8.

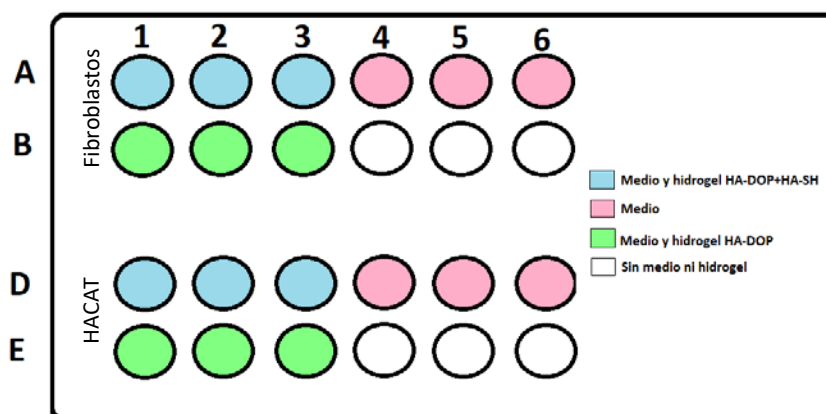


Imagen 8. Esquema placa con hidrogeles y células.

Aquellos pozos en los que no tenemos hidrogeles nos sirvieron como controles positivos (los que contenían medio) y controles negativos (aquellos que no pusimos medio).

Guardamos la placa en la incubadora durante 24h. Pasadas estas horas se le cambió el medio y pasadas otras 24h realizamos la prueba del alamar blue a esta misma placa, en este caso retiramos el medio de nuestras células y le añadimos una solución de 0.4ml de amar blue en 3.6ml de medio. Volvimos a poner en la incubadora y tras pasar 4h hicimos la lectura.

3.2.8. Estabilidad de los hidrogeles.

Preparamos hidrogeles de HA-DOPA y HA-SH+HA-DOPA de 100mg (6 réplicas de cada uno de ellos). En tres de los replicados de cada uno de nuestros hidrogeles añadimos 400 µl de solución tampón PBS pH 7.4 y en los otros tres, 400 µl hialuronidasa (HNaSe) 10 u/ml (la hialuronidasa se trata de una enzima que tiene como función degradar el HA). Dejamos en la incubadora a 37°C durante 24h por tal de que la enzima hiciese su función de degradación. Tras pasar estas 24h, retiramos 300µl de líquido, el cual se congela para que el PBS y la hialuronidasa paralicen su efecto degradante. De estas replicas cogimos 300 µl del líquido y lo guardamos en el congelador, por tal de que la hialuronidasa y el PBS no siguiesen efecto degradante.

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, año 2018-2019. Todos los derechos reservados

3.2.9. Respuesta de los hidrogeles a los diferentes estímulos

Para la realización de los test de pH, redox y temperatura partimos de hidrogeles de 60mg a concentración 1.5%, en los cuales 20µl del volumen total fue del compuesto fluorescente. Este compuesto fluorescente es la fluoresceína (10mg $C_{12}H_{11}NO_5S$ en 10ml de solución tampón PBS pH 7.4). La composición de volumen para los diferentes hidrogeles lo podemos ver en la siguiente imagen.



Imagen 9. Esquema formación hidrogeles 60mg 1.5%.

Pusimos a incubar a 37°C durante 2h tapados con papel de plata, por tal de que el compuesto fluorescente no se viese afectado por la iluminación, y cuando los hidrogeles se encontraron gelificados realizamos los test de pH, redox, temperatura y enzimas.

3.2.9.1. pH

Para realizar el test del pH empezamos realizando la solución tampón Britton-Robinson a partir del cual conseguimos diferentes pH. Para realizar esta solución tampón necesitamos 1.24g H_3BO_3 , 1.948g H_3PO_4 , 1.44ml CH_3COOH y agua milli-Q (hasta completar 500ml). A partir de esta solución tampón modificamos con NaOH hasta obtener soluciones de pH 2, pH 5, pH 7 y pH 10.

En los hidrogeles comentados anteriormente añadimos 100 µl de una de las soluciones a diferente pH, además añadimos dos controles, uno con 347.5 µl de agua y 20 µl de

fluoresceína, y otro con el hidrogel y 100 µl de agua. Dejamos en la incubadora a 37°C y tomamos la medida de absorbancia en una placa negra a la hora y las 2h.

3.2.9.2. Redox

A partir del artículo *Redox-Responsive Micellar Nanoparticles from Glycosaminoglycans for CD44 Target Drug Delivery*¹¹ haremos nuestro test redox.

Primero preparamos la solución del reactivo redox que añadimos a los hidrogeles comentados anteriormente. Pesamos 0.154g C₄H₁₀O₂S₂ el cual haremos en concentraciones 75mM, 100mM, 150mM, 175mM y 200 mM en 5ml de agua milli-Q.

Los cálculos necesarios los podemos ver a continuación:

$$5ml \cdot \frac{1l}{1000ml} \cdot \frac{200mM}{1l} \cdot \frac{1mol}{1000mM} \cdot \frac{154.25g \text{ ditioneitol}}{1mol} = 0.15425g \text{ (200nM)}$$

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2 \rightarrow 175 \cdot 5 = 200 \cdot V2 \rightarrow V2 = 4.375ml \text{ (0.625ml agua)}$$

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2 \rightarrow 150 \cdot 5 = 175 \cdot V2 \rightarrow V2 = 4.285ml \text{ (0.714ml agua)}$$

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2 \rightarrow 125 \cdot 5 = 150 \cdot V2 \rightarrow V2 = 4.166ml \text{ (0.833ml agua)}$$

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2 \rightarrow 100 \cdot 5 = 125 \cdot V2 \rightarrow V2 = 4 \text{ ml (1ml agua)}$$

$$V1 \cdot C1 = V2 \cdot C2 \rightarrow 75 \cdot 5 = 100 \cdot V2 \rightarrow V2 = 3.75ml \text{ (1.25ml agua)}$$

Pasadas las 2h de formación del hidrogel, pusimos en los diferentes replicados (R) de nuestros hidrogeles 300 µl de las diferentes soluciones de ditioneitol (DTT), e igual que en el caso anterior, hicimos dos tipos de control. Dejamos incubando tapados a 37°C durante 1h, realizamos la medida y volvimos a media a las 2h.

3.2.9.3. Temperatura

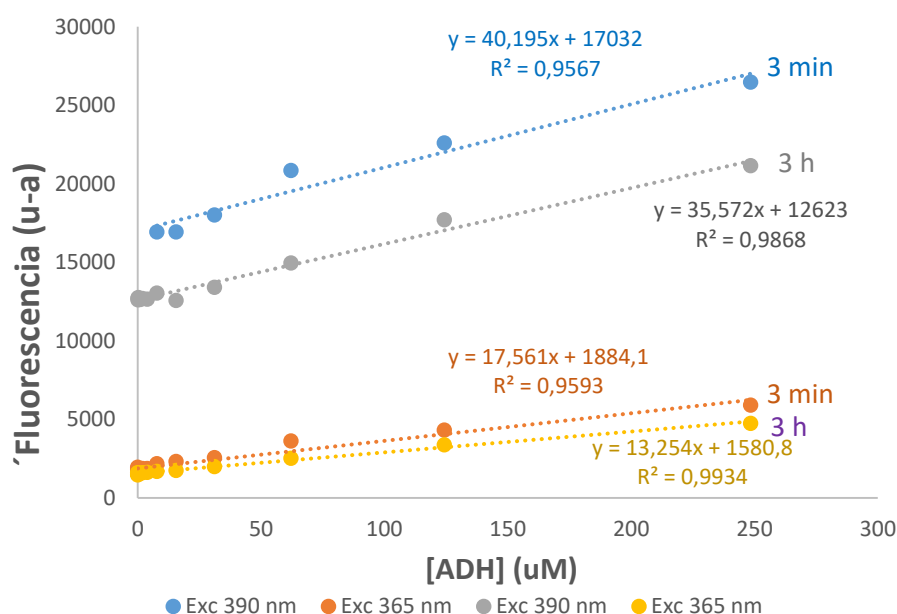
A partir de los hidrogeles comentados anteriormente añadimos 300 µl de agua milli-Q a cada uno de ellos y los pusimos a diferentes temperaturas. Pasadas 1 y 2h medimos la absorbancia. Las temperaturas a las que pusimos los diferentes hidrogeles fue 4°C (en nevera), 25°C (temperatura ambiente), 37°C, 50°C y 70°C (en termobloc), además realizamos un control en blanco (a temperatura ambiente).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Síntesis de HA-ADH, HA-SH y HA-DOPA

4.1.1. HA-ADH

Tras la caracterización del HA-ADH obtenemos esta gráfica donde se muestra la recta de calibrado a dos tiempos y para dos longitudes de onda de excitación. Los resultados numéricos de la recta de calibrado lo podemos ver en anexos.



Gráfica 1. Recta de calibrado fluorescamina.

Como podemos comprobar en la tabla 3, realizamos la medida de la fluorescencia para diferentes concentraciones de nuestro HA modificado. En todas ellas encontramos que los valores se encontraban fuera del rango lineal de la recta de calibrado, por lo que deberíamos realizar concentraciones más bajas hasta obtener valores dentro de la recta de calibrado. Si bien, como podemos ver en anexos, al realizar concentraciones más bajas los pesos son menores y supone una dificultad llegar a pesar de forma precisa el HA modificado. A su vez, la primera vez que realizamos la medida, nos encontramos que existía poca diferencia entre la fluorescencia obtenida a los 3' ya las 3h, por lo que se decidió seguir analizando las diferentes concentraciones únicamente para 3'.

Tabla 3. Medida fluorescencia de nuestras muestra

Muestras	3 min		3h	
	Exc 390 nm	Exc 365 nm	Exc 390 nm	Exc 365 nm
HA-ADH 1%	41340	13152	42775	15068
HA-ADH 0,75%	42269	13513	43530	15465
HA-ADH 0,5 %	43708	13969	42506	14654
HA 1%	19320	5444	23555	7793
HA 0,75%	23862	7202	22221	6971
HA 0,5%	25143	7942	17308	4954
HA-ADH 0,2%_R1	23275	13736		
HA-ADH 0,2%_R2	24077	14339		
HA-ADH 0,2%_R3	23685	13858		
HA 0,2%_R1	10980	5533		
HA 0,2%_R2	13141	7146		
HA-ADH 0.1% R1	37328	10379		
HA-ADH 0.1% R2	35145	9465		
HA-ADH 0.1% R3	37609	10605		
HA-ADH 0.05% R1	41886	8348		
HA-ADH 0.05% R2	44405	9831		
HA-ADH 0.05% R3	39677	9899		
HA 0.1% R1	14549	3278		
HA 0.1% R2	16360	4120		
HA 0.1% R3	19944	5149		
HA 0.05% R1	11130	2099		
HA 0.05% R2	11347	2027		
HA 0.05% R3	11926	2536		

Observando los resultados por el método colorimétrico, determinamos que nuestras muestras contienen grupos amino, pero no podemos cuantificar la cantidad de estos grupos que contienen nuestros hidrogeles, por lo que se utiliza espectroscopia para cuantificarlos.

Utilizamos la espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) para confirmar la modificación del HA con ADH. Los resultados obtenidos los podemos ver a continuación (en los anexos encontramos la RMN del HA sin modificar).

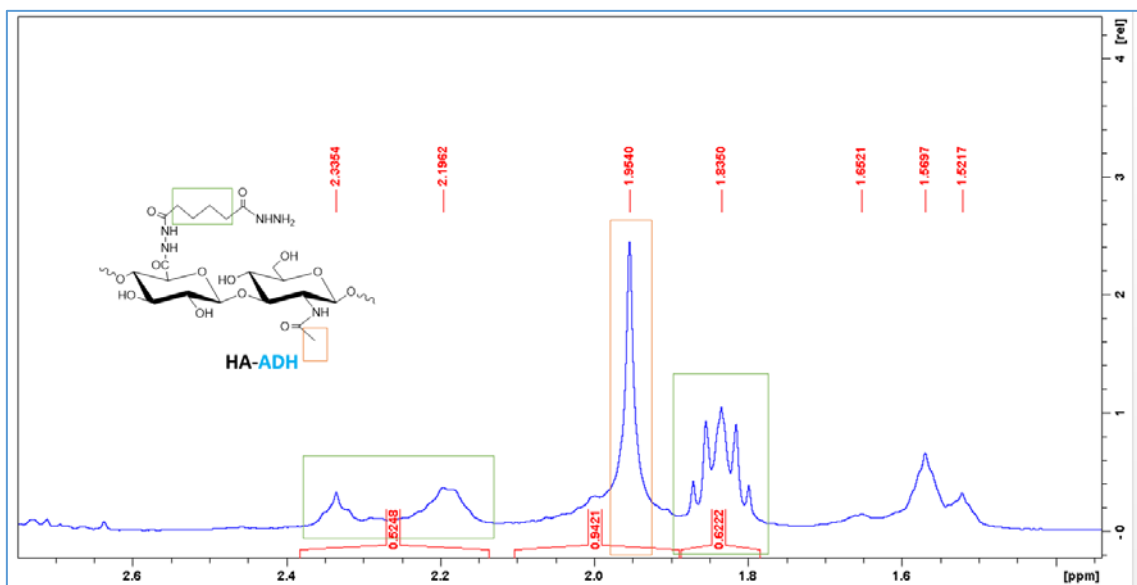
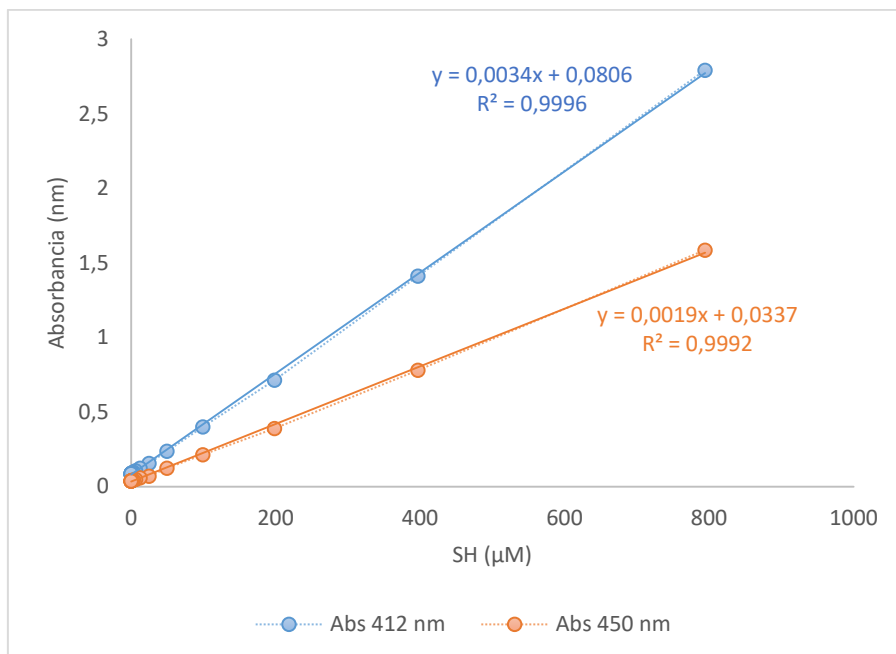


Imagen 10. Espectro de RMN del HA-ADH.

Se registró el espectro de RMN del HA-ADH en agua deuterada (D_2O). Como se indica en la imagen, se identificó las señales de los protones correspondientes al grupo metilo ($-CH_3$) (color naranja) de la cadena de HA en un desplazamiento de alrededor de 2 ppm. También se identificaron que las señales correspondientes a los protones de la cadena alquímica (en verde) correspondientes al grupo ADH conjugado al HA. Conociendo el valor de la integral de los picos, así como el número de protones a los que corresponde es posible determinar un grado de modificación de alrededor del 50%.

4.1.2. HA-SH

Para la caracterización de los grupos tiol realizamos la medida de la absorbancia a dos longitudes de onda y a dos tiempos. El motivo de realizar esta medida en dos tiempos diferentes es a causa de que, en el primer tiempo la muestra es líquida, puesto que no se ha formado el hidrogel, y por lo contrario en el segundo tiempo la muestra se encuentra en forma de gel.



Gráfica 2. Recta de calibrado del ensayo de Ellman.

La absorbancia de nuestras muestras las podemos ver en la siguiente tabla:

Tabla 4. Absorbancia muestras HA-SH.

Muestras	30 min	
	Abs 412 nm	Abs 450 nm
HA-SH 1%	0,6747	0,3786
HA-SH 0,75%	0,5661	0,3122
HA-SH 0,5 %	0,3663	0,2038
HA 1%	0,1521	0,0811

A partir de las rectas que hemos obtenido y de nuestras muestras podemos determinar la cantidad de grupos SH que contiene nuestro HA modificado.

Por una parte sustituimos en la fórmula de la recta el valor correspondiente, obteniendo el valor de X (μM) y a partir de aquí aplicamos la fórmula siguiente (en la fórmula se sustituirá la cantidad de gramos de polímero según concentración):

$$SH = \frac{100ml \cdot \frac{x (\mu M)}{1000ml}}{1g \text{ polímero}}$$

Una vez tenemos los resultados para cada muestra (lo encontramos en anexos) realizamos la media geométrica de nuestras muestras obteniendo un valor de 17.7729±1.14 μM SH/g.

Finalmente, realizamos el estudio del polímero de HA-SH con RMN como podemos observar en la imagen 12. En rojo se presenta el espectro de RMN de HA-ADH para su comparación con el de HA-SH. A partir de la comparación, se observa la aparición de nuevas señales o el desplazamiento de otras (marcadas en lila) que pertenecen a la molécula del reactivo de Traut añadido en el HA-ADH. Por tanto, podemos demostrar la incorporación grupos tiol a la cadena de HA-ADH. Por otro lado, las nuevas señales aparecen solapadas a las del compuesto ADH, complicando la identificación y asignación de los protones con cada señal. Por tanto, no es posible utilizar este espectro de RMN para cuantificar el grado de modificación del HA-SH, pero si lo hemos podido determinar con el método colorimétrico.

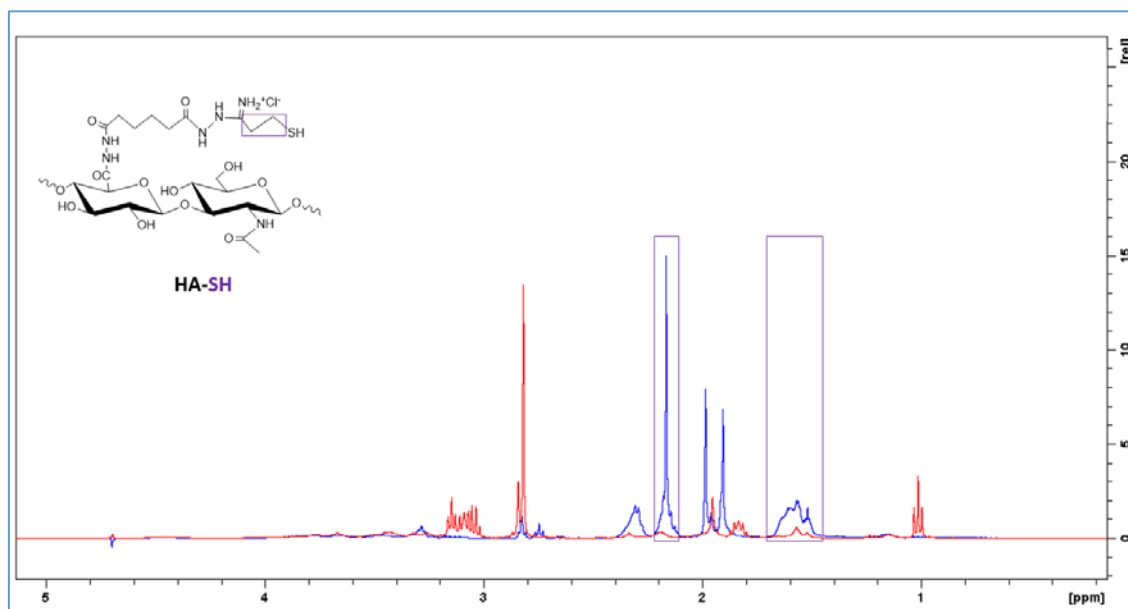
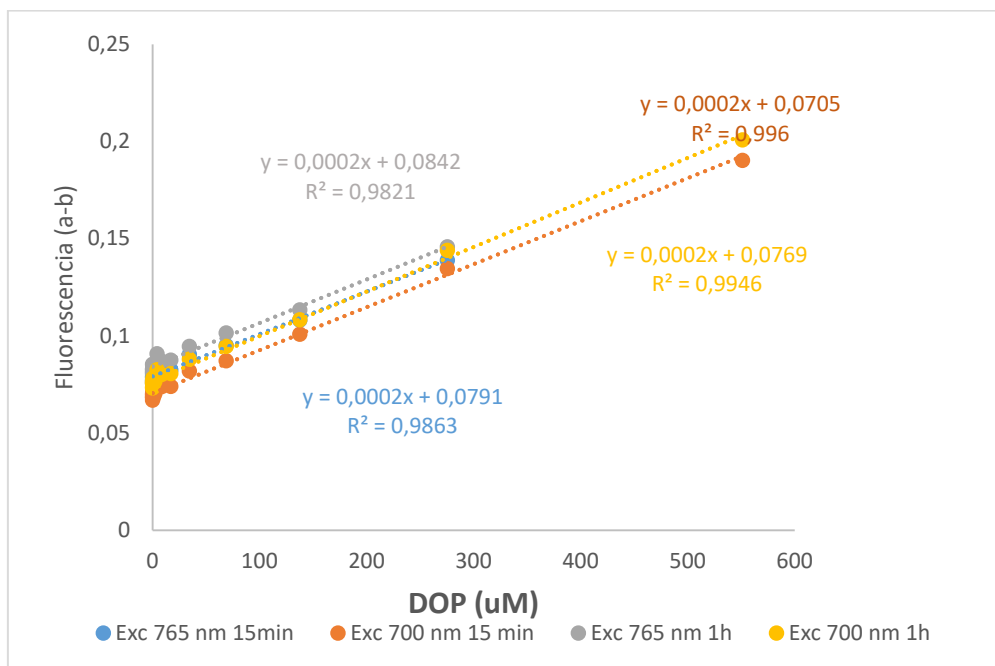


Imagen 11. Espectro de RMN del HA-SH.

4.1.3. HA-DOPA

Para la caracterización de los grupos fenol realizamos la medida de la fluorescencia en diferentes longitudes de onda y tiempos.



Gràfica 3. Recta de calibrado dopamina en el ensayo con Folin-Ciocalteu.

La tabla 5 nos muestra la fluorescencia de nuestras muestras, donde encontramos similitud en los resultados para las diferentes condiciones lo que nos indica una buena sensibilidad de nuestras muestras.

Tabla 5. Fluorescencia muestras HA-DOPA.

Muestras	15 min		1h	
	Exc 765 nm	Exc 700 nm	Exc 765 nm	Exc 700 nm
HA-DOPA 0,5%_R1	0,91219997	0,95179999	0,90189999	0,94309998
HA-DOPA 0,5%_R2	1,00199997	1,04560006	0,98989999	1,04110003
HA-DOPA 0,75%_R1	1,02419996	1,07130003	1,01030004	1,06400001
HA-DOPA 0,75%_R2	0,76749998	0,80220002	0,75139999	0,79110003
HA 0,5%_R1	0,72509998	0,73659998	0,70139998	0,71509999
HA 0,5%_R2	0,78649998	0,80150002	0,76050001	0,77770001
HA 0,75%_R1	0,4725	0,47549999	0,45190001	0,45559999
HA 0,75%_R2	0,80000001	0,8391	0,77539998	0,80589998

A partir de estos valores, podemos cuantificar los grupos fenol que existen en nuestras modificaciones, teniendo en cuenta, que un μM de dopamina está formado por dos grupos fenol.

Primero restamos el grupo control a los diferentes muestras, obteniendo el valor de la fluorescencia para la modificación y seguidamente realizaremos la media geométrica de ellos, obteniendo así la cantidad de fenoles contenidos en un gramo de nuestro HA modificado. (Los resultados de los cálculos los encontramos en anexos).

Encontramos que en nuestras muestras existen $30.52\mu\text{M}$ de dopamina, lo que se corresponde a $61.04\mu\text{M}$ de fenol en 1g de nuestro HA-DOP.

Finalmente, como en los casos anteriores, realizamos el estudio de este polímero con RMN. En el RMN podemos observar en amarillo el pico correspondiente al grupo metilo ($-\text{CH}_3$) de la cadena de HA que se mantiene constante en todos los procesos de modificación química (el espectro del HA sin modificar lo encontramos en anexos). Como se puede observar en la ampliación de la región de 7 ppm, vemos la aparición de varios picos que corresponden a los protones del anillo aromático de la dopamina (naranja). Se demuestra por tanto, que se ha podido realizar con éxito la incorporación del compuesto fenólico en la cadena de HA.

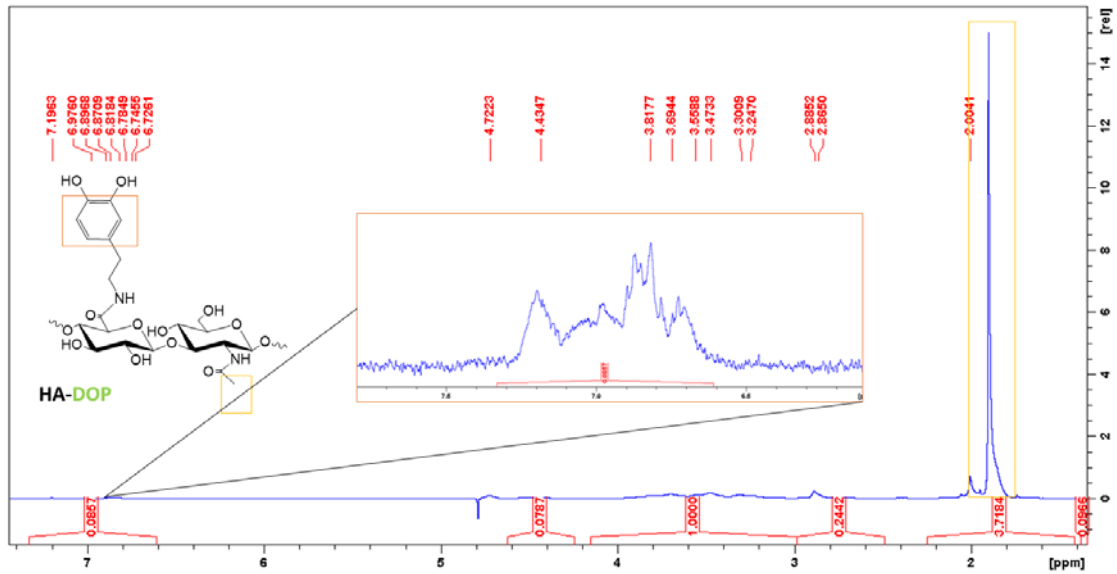


Imagen 12. Espectro de RMN del HA-DOPA.

4.2. Preparación de los hidrogeles mediante la enzima lacasa

Cuando añadimos la enzima lacasa a la mezcla de HA modificado en presencia de oxígeno y de una cierta temperatura, producimos la oxigenación del compuesto fenólico dopamina formándose una molécula tipo quinona muy reactiva ($-\bullet H$). Esta molécula reacciona con otro grupo fenol (en el caso del hidrogel HA-DOPA) o con un grupo tiol (en el hidrogel HA-DOPA+HA-SH) proporcionando un aumento de la viscosidad y una tonalidad amarronada de los hidrogeles proveniente de la oxigenación de la dopamina.

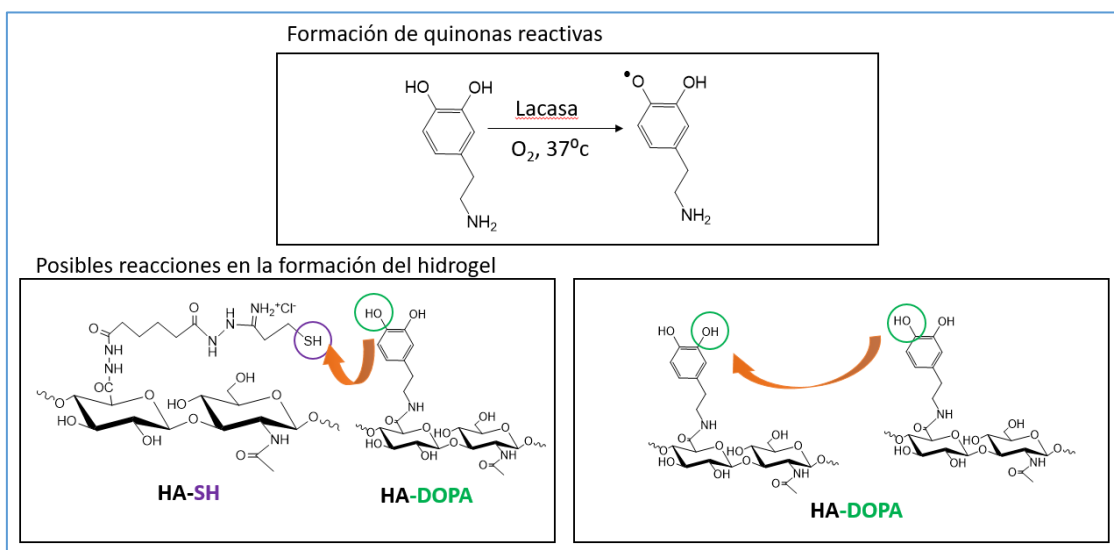


Imagen 13. Esquema reacción enzima lacasa con HA modificado.

Si observamos la imagen 14 que se realizó a las 2h de incubación, podemos comprobar que los pozos que contenían lacasa tenían una tonalidad diferente a los pozos sin lacasa. Esto es debido a que, como hemos comentado anteriormente, la lacasa provoca oxidación aportando una tonalidad amarronada.

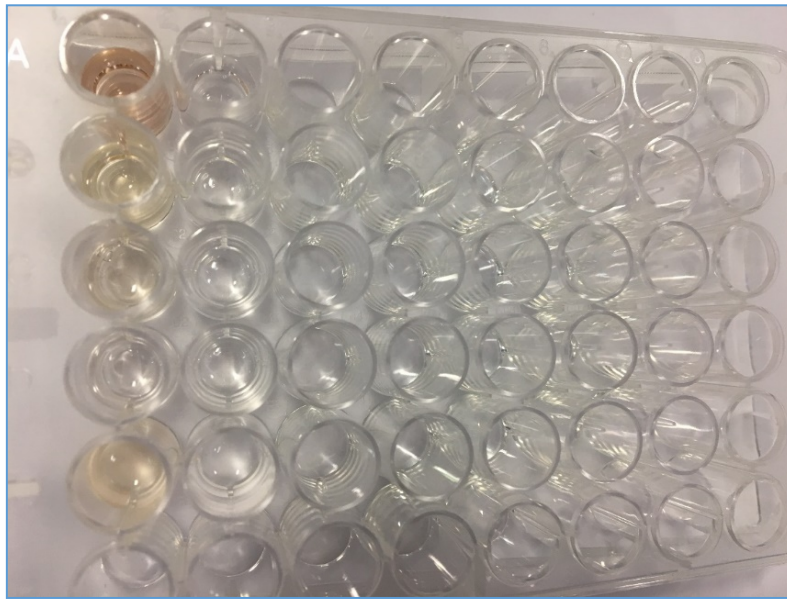


Imagen 14. Hidrogeles con y sin lacasa tras 2h incubando con agitación.

Dentro de los pozos de la fila 1 vemos diferentes tonalidades provocadas por la reacción de oxidación, siendo el pozo correspondiente a la HA-DOPA el más marrón. Comprobamos a su vez la forma en gel de estos hidrogeles, y comprobamos que el HA-DOPA+HA-SH₂, era el más viscoso y los otros pozos eran viscosos pero no tanto como deberían, por lo que decidimos dejar 2h más para ver si se acababan formando los hidrogeles. En la imagen 15 podemos ver como se encontraban nuestras muestras tras pasar otras 2h.



Imagen 15. Hidrogeles 450 μ l tras 4h incubando con agitación.

Al igual que en el caso anterior, vemos como los pozos de la fila 2 no han reaccionado, y que nuestras muestras tienen diferentes coloraciones. Las muestras HA-DOPA+HA-SH₁ la encontramos poco gelificada, por lo que las descartamos para próximas experimentaciones, puesto que lo que buscábamos con esta prueba era crear un hidrogel, y con estas muestras la textura no es la idónea para los hidrogeles.

La muestra de HA-DOPA era viscosa y podemos ver que es la que más reaccionó a la oxigenación, puesto que tiene tonalidad marrón. En este caso, se trata de un buen hidrogel, pero por ejemplo, en el caso de lentes de contacto, no podríamos hacer uso de él puesto que por la tonalidad que adquiere dicho hidrogel, provocaría que la lente no fuese transparente y provocase cambios de la sensibilidad al contraste y pérdida de la calidad de visión en ciertos casos.

Las muestras de HA-DOPA+HA-SH₂ y HA-DOPA+HA-SH₃ también formaron un buen hidrogel, siendo la primera la que más gelificada quedó (las muestras de los diferentes HA-DOPA+HA-SH eran producciones diferentes). Si observamos la imagen anterior donde la placa se encuentra inclinada, comprobamos como el pozo C1 tiene poca (o incluso nula) inclinación de la muestra, por lo que se trata de un buen hidrogel, como anteriormente ya habíamos podido comprobar. A su vez D1 observamos una inclinación

de la muestra, lo que nos hace pensar que es más líquido, pero tras comprobarlo con la ayuda de una espátula encontramos un material gel.

Comprobando que se formaban hidrogeles con nuestros HA modificados realizamos otra placa con el doble de volumen, quedándonos la distribución que podemos observar en la imagen 16. Volvimos a dejar en la incubadora 2h a 37°C y al finalizar observamos lo de las imagen 16.

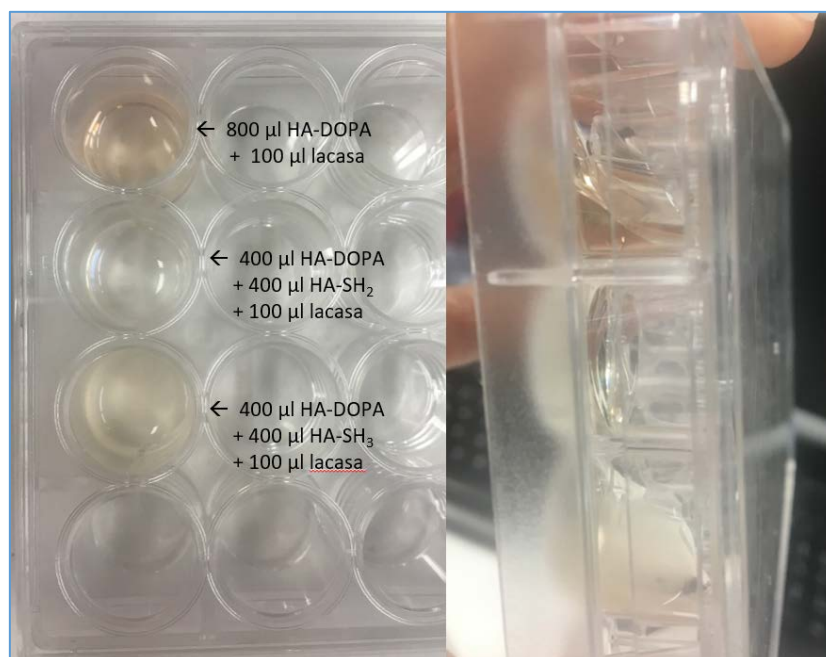


Imagen 16. Hidrogeles 900µl tras 2h de incubación y agitación.

Como en el caso anterior comprobamos que el pozo B1 es el que queda en forma más de gel y con una mayor transparencia. Aun así, volvimos a dejar otras 2h puesto que los pozos A1 y C1 tenían una textura más líquida que la que nos interesaba.

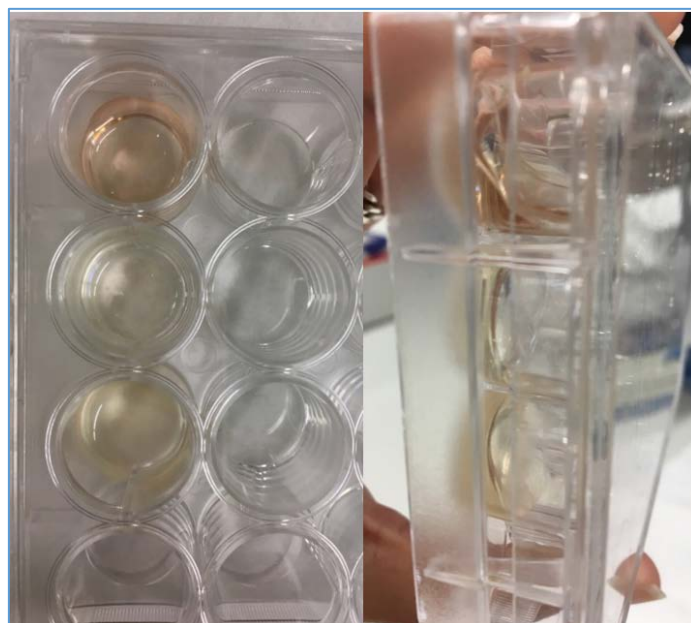


Imagen 17. Hidrogeles 900µl tras 4h de incubación y agitación.

En la imagen 17 podemos ver como quedaron tras 4h en incubación y agitación. A1 queda algo líquida pero sí que crea un hidrogel, B1 seguimos teniendo una textura gel como se desea y C1, aun teniendo una mezcla turbia, también ha formado hidrogel. Si comparamos estas imágenes con las anteriores, donde habían pasado 2h, podemos comprobar que los colores de las muestras tras pasar 4h son más marrones, por lo que dichas muestras han reaccionado y se han oxidado más que en el caso de las 2h.

Volvimos a realizar la experimentación anterior de la creación de los hidrogeles, pero en este caso lo realizamos únicamente para el HA-DOPA y el HA-SH (que anteriormente habíamos denominado HA-SH₃) concentración 1%. En este caso, por facilidad de manipulación, decidimos realizar las muestras directamente con el peso exacto en eppendorfs.

Como nos ha pasado en los casos anteriores, tras pasar las 2h el que únicamente contiene HA modificado con DOPA lo encontramos de una tonalidad más amarronada que en el caso del modificado con SH. Respecto a la viscosidad, podemos ver, que estando los eppendorfs girados el contenido no vuelca, por lo que tienen una

consistencia gel. Si lo comprobamos con la ayuda de una espátula podemos observar que tienen una buena viscosidad, tal como se ve en la imagen 18.

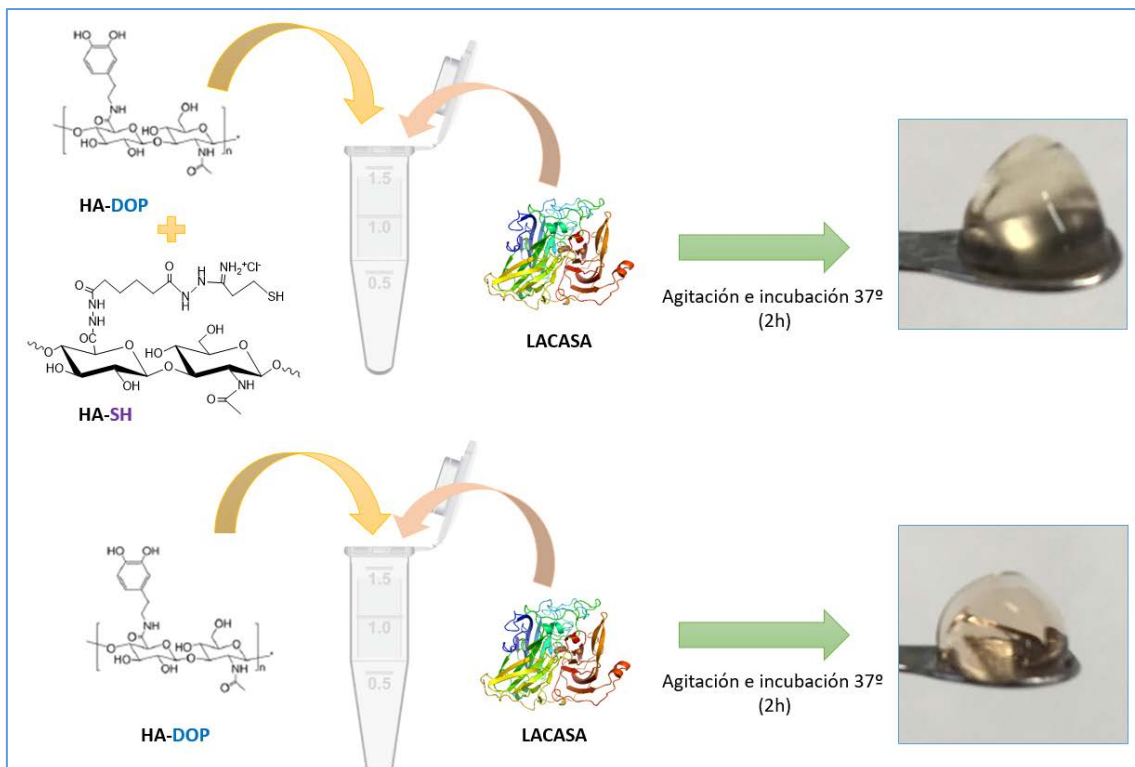


Imagen 18. Formación hidrogeles.

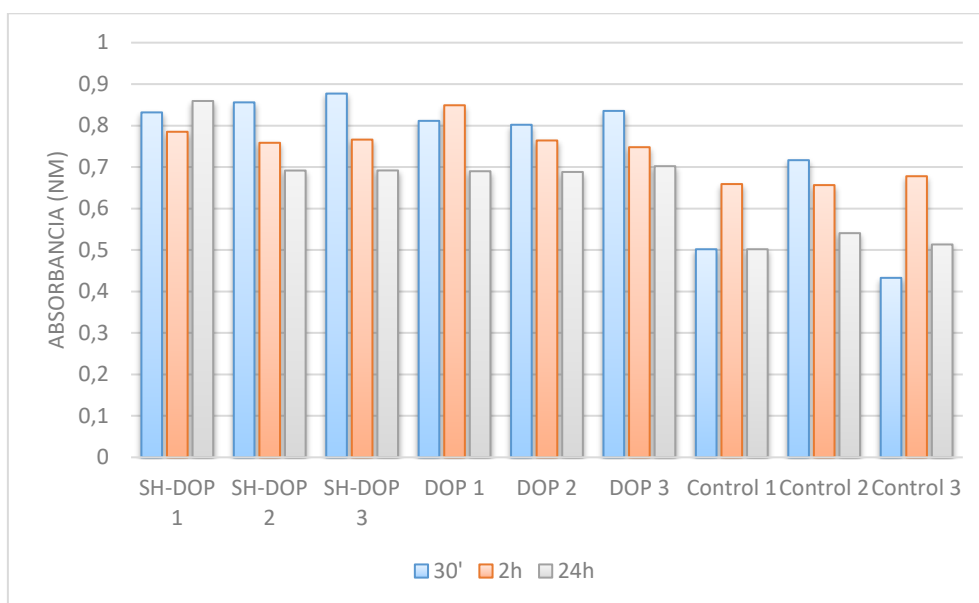
4.3. Capacidad antioxidante con el reactivo DPPH

Tras realizar las tres medidas (a diferentes tiempos), obtenemos la gráfica 4 donde podemos observar como nuestras muestras tienen una absorbancia mayor que los controles realizados. Tanto las muestras de HA-DOPA (en la gráfica mostradas como DOP) como las de HA-SH+HA-DOPA (en la gráfica mostradas como SH-DOP) siguen un valor de absorbancia similar, siendo algo más elevado en los SH-DOP, pero ambos por encima del 0.8. Teniendo en cuenta que los controles, en los que no existen grupos fenol ya encontramos una absorbancia entorno los 0.5-0.7, podemos determinar que la cantidad de dopamina no es suficiente para que el hidrogel sea antioxidante. Una de las posibles razones es debido a que, en el proceso de creación del gel han reaccionado gran cantidad de los grupos fenol, existiendo una baja cantidad de estos grupos que puedan actuar como antioxidantes.

Facultat d'Òptica i Optometria de Terrassa

© Universitat Politècnica de Catalunya, año 2018-2019. Todos los derechos reservados

Una forma de conseguir encontrar más grupos fenol libres, sería aumentar la modificación del HA, por ejemplo añadiendo mayor cantidad de dopamina, y permitiendo que exista un mayor porcentaje de fenoles libres que puedan desencadenar su acción antioxidante.



Gráfica 4. Resultados DPPH

4.4. Biocompatibilidad

Tras la lectura del cultivo celular con hidrogeles encontramos estos valores de absorbancia:

Tabla 6. Absorbancia del cultivo celular

FIBROBLASTOS	Control +	Control -	HA-SH+HA-DOPA	HA-DOPA
	38511	1398	35342	36698
	35855	1113	38636	37219
	38710	1003	38337	37127
HACAT	38804	1216	37353	37197
	38593	1245	37944	37676
	37502	999	37777	37875

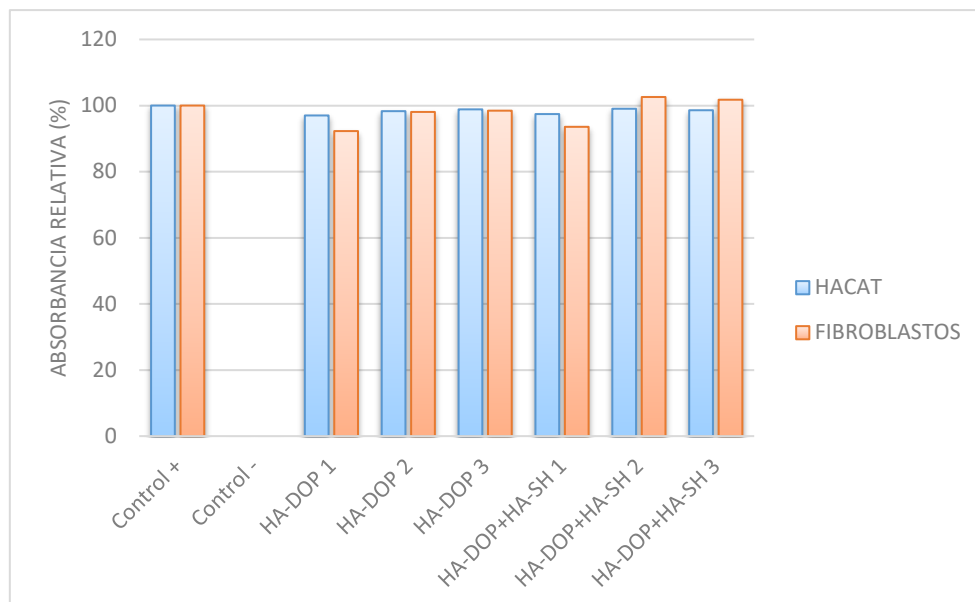
Con estos datos podemos aplicar la fórmula siguiente, a partir de la cual podremos determinar si nuestros hidrogeles son tóxicos para las células epiteliales anteriores.

$$x = \frac{F_{\text{muestra}} - F_{\text{control}(-)}}{F_{\text{control}(+)} - F_{\text{control}(-)}} \cdot 100$$

De esta fórmula, el valor tanto de los controles positivos como negativos los obtenemos a partir de la media de los 3 valores medidos. Si el resultado de esta fórmula (en tanto por ciento) es mayor a 80, nos indicará que nuestro hidrogel es biocompatible, y por lo tanto no serán tóxicos para el epitelio. Estos resultados los podemos ver en la siguiente tabla y en la gráfica:

Tabla 7. Biocompatibilidad hidrogeles.

FIBROBLASTOS	HA-SH+HA-DOPA (%)	HA-DOPA (%)
	93,5652878	97,2782537
	102,584838	98,704843
	101,766123	98,4529309
HACAT	97,4264585	97,0023649
	99,0331209	98,3045498
	98,5791232	98,845541



Gráfica 5. Biocompatibilidad hidrogeles.

Como podemos observar los resultados obtenidos son cercanos al 100% en todos los casos, por lo que podemos asumir que los hidrogeles no son tóxicos para estas células

epiteliales. En algunos casos encontramos que nuestros hidrogeles superan el 100%, esto puede ser debido a que existe una proliferación de las células en contacto con el hidrogel.

En este caso se trata de células epiteliales de la piel, resultaría interesante poder realizar este mismo proceso para células del epitelio corneal, para comprobar ver si reaccionan de forma similar, o por lo contrario, estos hidrogeles podrían resultar menos biocompatibles con el tejido ocular. Si bien, esto resulta dificultoso, puesto que el ojo es una estructura difícil de estudiar, donde la mayoría de estudios se realiza a partir de animales.

4.5. Estabilidad

En las imágenes siguientes podemos ver diferentes tiempos del hidrogel, en la imagen 19 aparecen los hidrogeles sin incorporar el PBS y el HNaSe, por el contrario en la imagen 20 podemos comprobar que tras pasar 96h, aquellos hidrogeles que se encontraban con HNaSe los vemos de tamaño más pequeño puesto que ha habido una mayor degradación respecto a los que se encuentran en PBS, los cuales apenas han sido degradados.



Imagen 19. Hidrogeles previos a incorporar la hialuronidasa y el PBS.

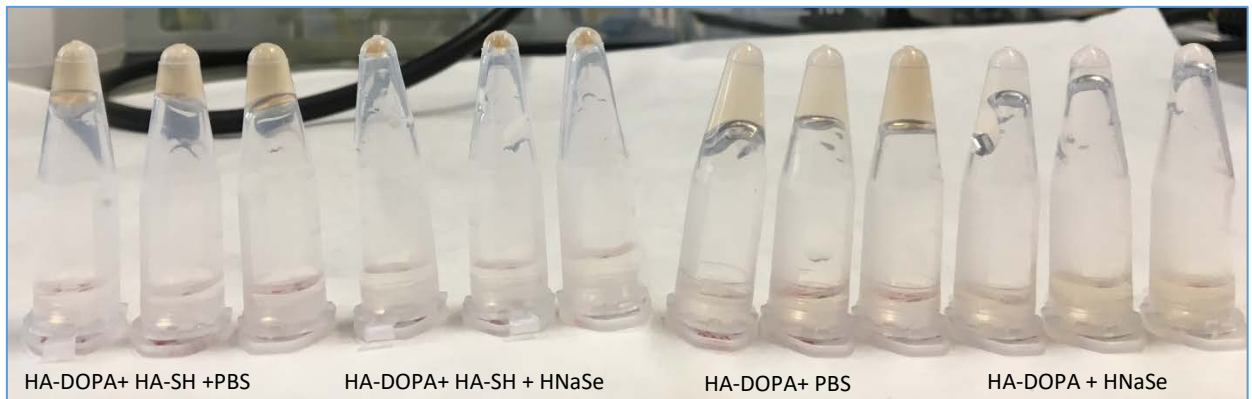


Imagen 20. Hidrogeles con hialuronidasa y PBS tras pasar 96h.

Pasadas 144h podemos observar la imagen 21 donde vemos como los hidrogeles de HA-DOPA con PBS se han degradado bastante, mientras que los de HA-DOPA+HA-SH siguen manteniéndose. Si bien, cuando cogimos la muestra HA-DOPA+HA-SH+PBS R2 el hidrogel se venía con nosotros, y se comenzaba a degradar más, por lo que tuvimos que centrifugar durante más tiempo que los otros hidrogeles.

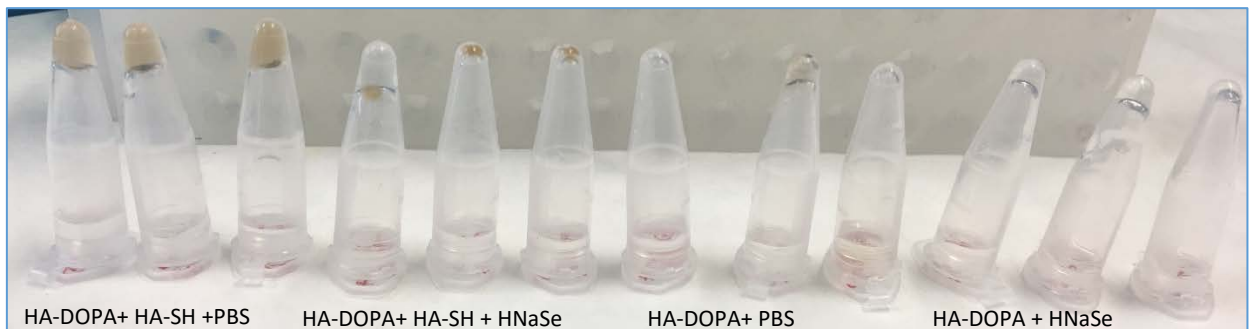


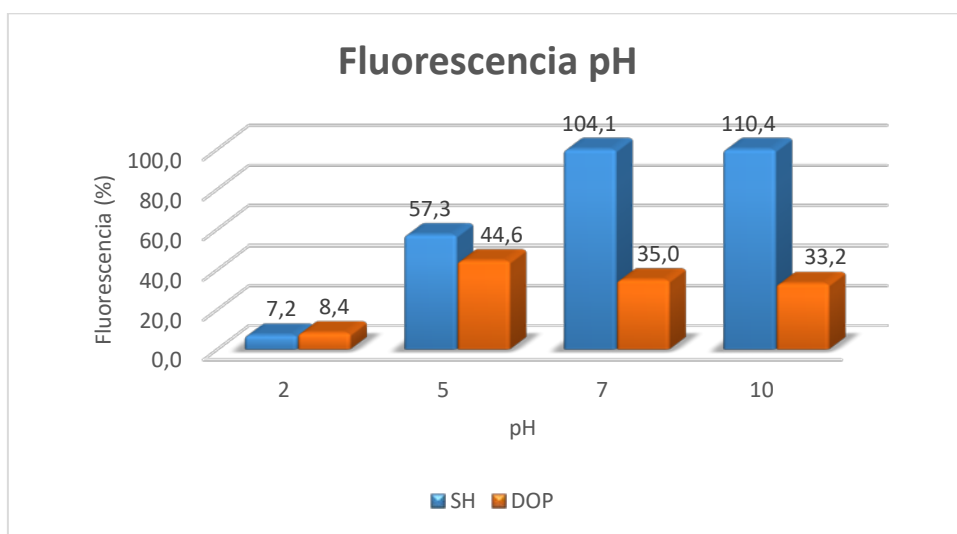
Imagen 21. Hidrogeles con hialuronidasa y PBS tras pasar 144h.

Tras pasar 4 días más, seguimos encontrando los mismos resultados de degradación. Aquellos hidrogeles que se encuentran con PBS se han degradado muy poco y siguen en consistencia viscosa, y por lo contrario, aquellos que contienen hialuronidasa se siguen degradando volviéndose líquidos.

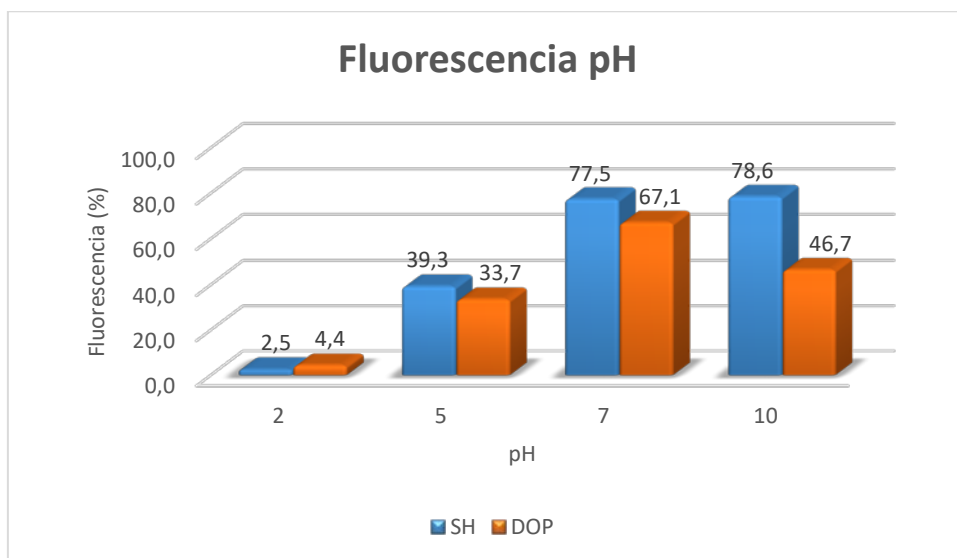
4.6. Respuesta a diferentes estímulos

4.6.1. pH

Realizamos la medida de fluorescencia del pH a los 30' y a los dos días, obteniendo las gráficas 5 y 6, donde el HA-DOPA+HA-SH lo denominamos SH y el HA-DOPA lo llamamos DOP.



Gráfica 6. Fluorescencia pH (30').



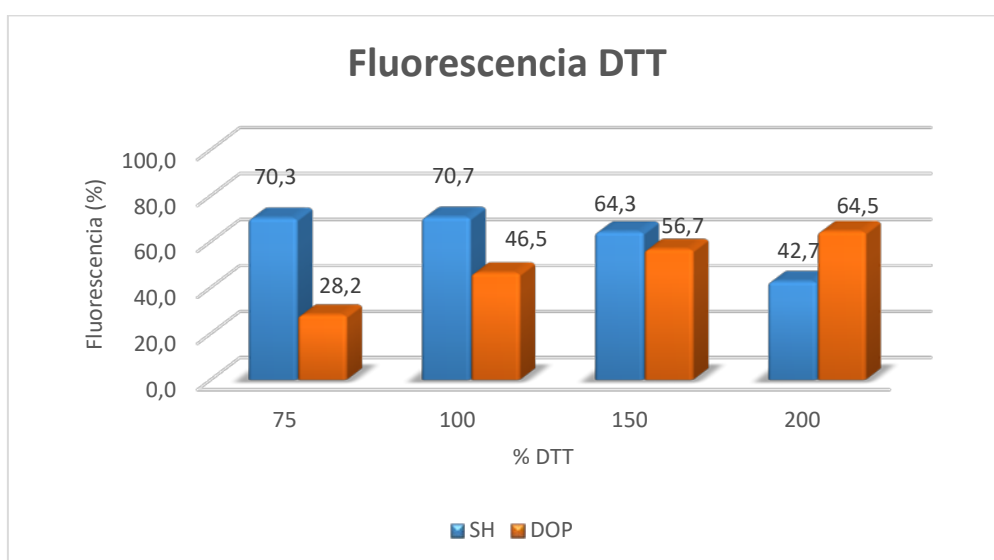
Gráfica 7. Fluorescencia pH (2 días).

Analizando las gráficas podemos ver como el hidrogel SH obtiene una mayor fluorescencia que el hidrogel DOP, lo que nos informa sobre la interacción que tiene

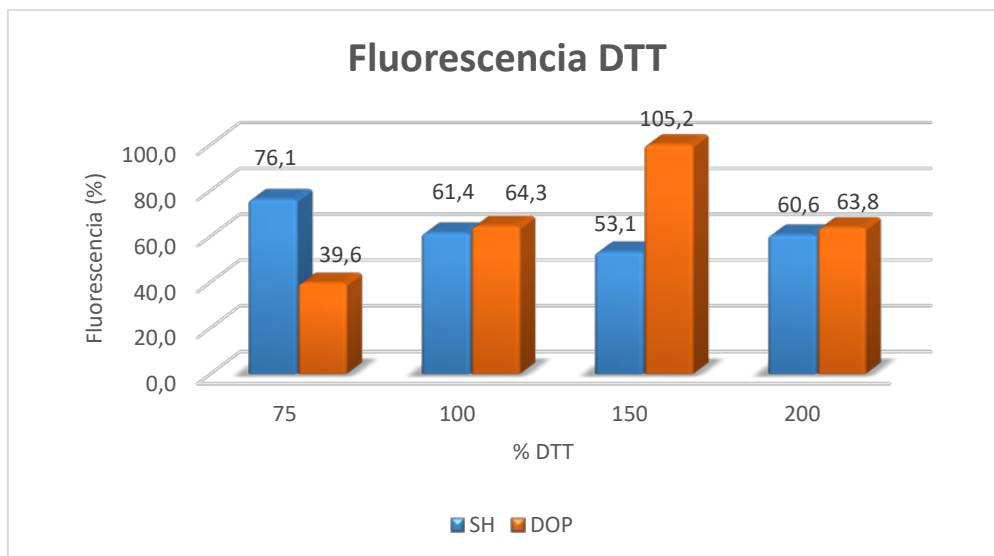
dicho hidrogel a diferentes pH. La tendencia que sigue es lineal, obteniendo una mayor degradación de la cadena del hidrogel a medida que aumenta el pH, dándonos así un valor mayor de fluorescencia. Esto nos indica que el hidrogel está respondiendo al estímulo liberando el compuesto fluorescente a medida que aumentamos el pH. Determinando esto, hemos de tener en cuenta que las propiedades que tienen nuestros hidrogeles no serán las mismas a diferentes pH, por lo que hay que tenerlo en cuenta para el uso que le vayamos a dar al hidrogel, o la vía de administración por la que se vaya a administrar.

4.6.2. Redox

Lo que se consigue con el compuesto DTT (reductor) es romper los diferentes enlaces de los hidrogeles. Al romper estos enlaces observaríamos un color más amarillento de nuestros hidrogeles (a causa del compuesto de fluoresceína que tienen incorporados) obteniendo a su vez un valor de fluorescencia mayor. A mayor concentración del compuesto DTT, en nuestro caso 200mM, debería provocar una mayor cantidad de rotura de enlaces y por lo tanto obtener una mayor fluorescencia. Los datos obtenidos de la fluorescencia se muestran en las gráficas 7 y 8.

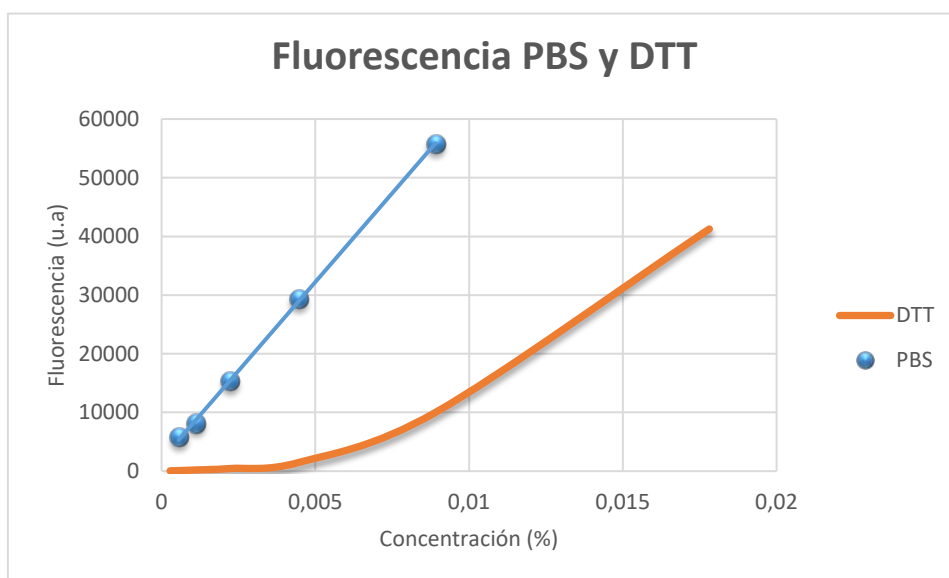


Gràfica 8. Fluorescencia DTT (30').



Gràfica 9. Fluorescencia DTT (2 días)

Comprobamos que no existe una linealidad de fluorescencia en nuestras muestras, como esperábamos que sucediese. En nuestro caso, se debería obtener un porcentaje más elevado de fluorescencia a medida que aumenta la concentración de la solución de DTT. Tras comprobar que este hallazgo no sucedía, sino que obteníamos valores de fluorescencia sin ninguna tendencia, decidimos realizar una recta de calibrado de la fluoresceína cuando le añadimos el reactivo DTT y con PBS, puesto que creemos que debe existir una reacción entre el DTT y la fluoresceína que a simple vista no observamos (como se observa en la imagen de anexos).



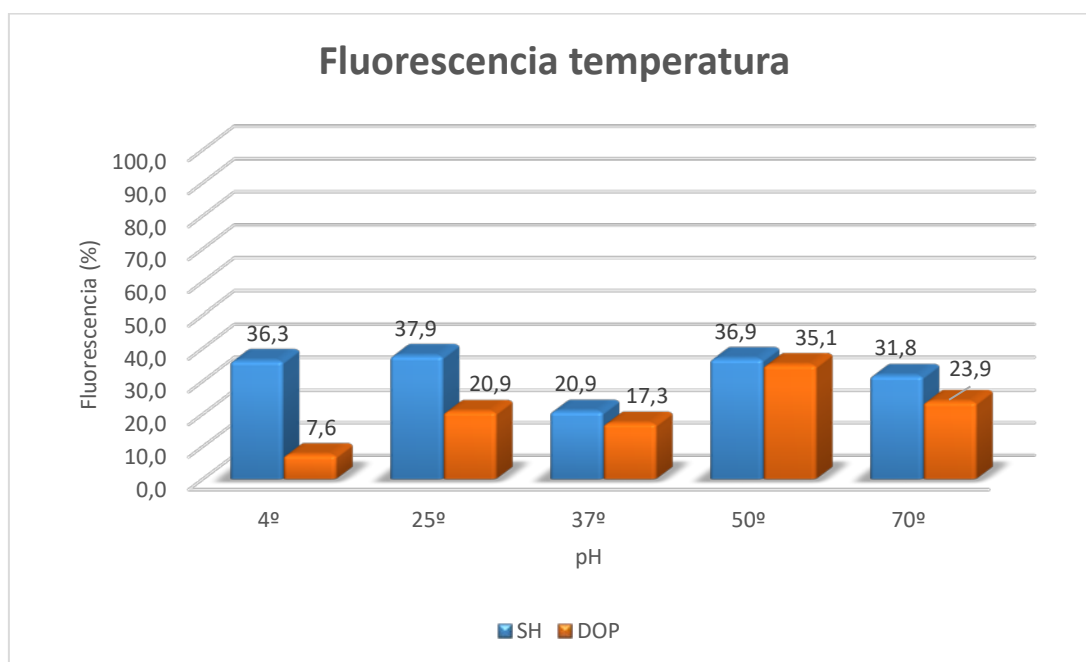
Gràfica 10. Fluorescencia fluoresceína con PBS o DTT

Como observamos en la gráfica, la fluorescencia añadiendo PBS sigue una tendencia lineal, al contrario de cuando se añade DTT a la fluoresceína, donde no observamos linealidad, y por lo tanto nos indica que existe una reacción entre nuestro DTT y la fluoresceína que nos está alterando los resultados.

Por tal de encontrar nuevos resultados fiables, sería recomendable hacer estudios con otro componente colorimétrico que no fuese la fluoresceína.

4.6.3. Temperatura

Realizamos la medida de la fluorescencia para diferentes temperaturas, ya que el hidrogel no tendrá la misma estructura y propiedades a temperaturas diferentes a las idóneas para su uso.



Gráfica 11. Fluorescencia temperatura.

Sabemos que los hidrogeles se forman a 37°C, puesto que es donde los dejamos incubando durante todo el proceso, pero como podemos observar, cuando cambiamos la temperatura la fluorescencia cambia, por lo que aparecen alteraciones en la estructura del hidrogel que cambian sus propiedades. En el hidrogel HA-DOP (denominado en estas gráficas DOP) es donde podemos ver mayores cambios a causa

de la temperatura en la que se encuentra el hidrogel, existiendo también cambios en HA-DOP+HA-SH (SH) pero no tan elevados.

Esto nos indica, como en el caso del pH, que el hidrogel actuará diferente según la temperatura de la superficie de contacto, por lo que hay que tenerlo en cuenta a la hora de aplicarlo en farmacología o incluso en oftalmología. En el caso de las lentes de contacto, sabemos que, no es recomendable mantenerlas en condiciones o lugares de elevada temperatura, ya que las propiedades se ven alteradas, así pues, sucederá lo mismo con nuestros hidrogeles. Las propiedades de estos se verán alterados e interactuarán de diversa forma en contacto a diferentes temperaturas.

5. CONCLUSIONES

En este proyecto hemos conseguido modificar químicamente el HA para incorporar grupos amino, tiol y fenol. Hemos comprobado colorimétricamente y con RMN que los HA que hemos sintetizado químicamente contienen los grupos que queríamos incorporar, aportándoles estructura y propiedades diferentes al inicial.

A partir de estos HA hemos creado hidrogeles, con la ayuda de la enzima lacasa, la cual inicia la reacción de oxidación de los compuestos fenólicos, en una síntesis sin reactivos químicos y en un solo paso. Estos hidrogeles los creamos a partir de HA-DOPA y de la mezcla de HA-DOPA y HA-SH, y tras comprobar que han creado un hidrogel (gel, viscoso) han sido sometidos a diferentes test con la finalidad de analizar sus propiedades.

Por una parte hemos puesto en contacto nuestros hidrogeles con células epiteliales de la piel, para comprobar que no fuesen tóxicos, y por lo tanto, se puedan aplicar para uso en biomedicina, y en concreto en oftalmología. La biocompatibilidad obtenida de nuestros hidrogeles ha resultado de un porcentaje elevado, aproximándose en la mayoría de ellos al 100%, incluso en algunos casos, como es en los hidrogeles que contienen dopamina, superan el 100%. Esto último es a causa, probablemente, de que

la dopamina y el HA, no solo no son tóxicos para las células epiteliales, sino que además favorecen su proliferación.

El componente antioxidativo de nuestros hidrogeles se debería volver a estudiar, añadiendo más concentración de dopamina en la síntesis del HA, por tal de que contenga más grupos fenol, que son los encargados las propiedades antioxidantes. A partir de este estudio se podría analizar si realmente son antioxidantes, ya que nosotros encontramos que no resultan buenos antioxidantes, pero que probablemente es causa de que, los grupos fenol reaccionan formando el hidrogel, por lo que quedan libres pocos compuestos fenólicos que permitan actuar como antioxidantes.

Respecto a la estabilidad, como hemos podido comprobar, nuestros hidrogeles en PBS se muestran estables, por el contrario con la hialuronidasa, enzima que tenemos en el cuerpo, provoca una degradación del hidrogel en poco tiempo. De los dos hidrogeles que hemos creado, se ha podido comprobar que el HA-DOPA+HA-SH es el que, aun existiendo degradación, se ha degradado menos, por lo que, dentro de los dos hidrogeles creados sería el más recomendado para fármacos oculares, ya que mantendría el fármaco durante más tiempo activo. En el globo ocular tenemos hialuronidasa, por tanto, si instilamos un fármaco con estos hidrogeles, tenemos que tener en cuenta que existirá un proceso de degradación a causa de dicha enzima.

Por último hemos comprobado que nuestros hidrogeles se ven alterados frente a cambios de pH, temperatura y al reactivo DTT (que actúa como agente reductor). En el caso del estímulo redox, hemos concluido que nuestro reactivo DTT ha reaccionado con la fluoresceína provocando una disminución de la fluorescencia, y por lo tanto, aportándonos datos no válidos. Esta prueba se debería volver a realizar cambiando el compuesto colorimétrico, por uno que observemos una recta lineal cuando lo medimos mezclado con DTT, lo que nos informará de que el DTT no se altera con este compuesto.

Respecto al pH y la temperatura, podemos concluir que nuestros hidrogeles se ven sometidos a cambios fisicoquímicos a causa de estos estímulos o cambios en el medio. Esto es de importancia respecto a los fármacos, puesto que sabremos que, la acción de dicho fármaco, el cual contiene uno de nuestros hidrogeles, puede cambiar a causa de agentes externos como puede ser el pH del ojo y sus estructuras internas y externas, la temperatura de la superficie ocular o del humor vítreo, o por último, por las condiciones de mantenimiento de dicho fármaco.

Así pues, podemos concluir que nuestros hidrogeles preparados a partir de HA podrían ser utilizados para la administración de diferentes fármacos dadas las condiciones que presentan. Hemos encontrado que nuestros hidrogeles son sensibles a estímulos externos, son biocompatibles y estables y tienen una tendencia a ser antioxidativos, pero se deberían realizar más estudios con mayor concentración de dopamina en el HA para poder afirmarlo. A su vez también se deberían de realizar estudios exhaustivos de la bioactividad de dichos materiales como: capacidad antimicrobiana, actividad antioxidante, inhibición de enzimas degradativas presentes en algunas condiciones oculares y liberación controlada de fármacos, entre otras.

En próximas investigaciones resultaría interesante realizar experimentos físico-químicos para determinar la posible aplicación de estos hidrogeles en diversos formatos de fármacos oculares (gotas, pomadas o inyectables, entre otras). Aun así podríamos asumir que nuestros hidrogeles se podrían aplicar en farmacología, ya que aportarían una viscosidad a los fármacos oculares, permitiendo una mayor absorción del principio activo, ya que al mantenerse en contacto con la superficie ocular más tiempo, el efecto es más prolongado provocando así, la reducción de la necesidad de dosis administrada y disminuyendo a su vez la posibilidad de RAM.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Ma Teresa Martínez Martínez. *Desarrollo y aplicaciones de hidrogeles para la administración y liberación modificada de fármacos*. Departamento de farmacia y tecnología. Universitat de València, 2016.
2. Alejandro Arredondo Peñaranda, Marta Elena Londoño López. *Hidrogeles. Potenciales biomateriales para la liberación controlada de medicamentos*. Revista ingeniería biomédica ISSN1909-9762; Enero-Junio 2009; 3 (5); 45-50.
3. J.L. Escobar, D.M. García, D. Zaldívar e Issa Katime. *Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos*. Revista Iberoamericana Polímeros; Julio 2002; Volumen 3.
4. A. Navarro Sentanyes. *Materiales ópticos orgánicos. Monturas y lentes*. (Año publicación 2007).
5. Marzleh Fathi, Jaleh Barar, Ayuob Aghanejad, Yadollah Omid. *Hydrogels for ocular drug delivery and tissue engineering*. Center for Pharmaceutical Nanotechnology, Faculty of pharmacy Tabriz University of Medical Sciences, 2015.
6. Olga Rubio-Romero, M. Elena Morales, Humberto Matiz-Moreno. *Opacificación bilateral de la lente intraocular de hidrogel: reporte de un caso*. Revista Mex Oftalmol Enero-Febrero 2005; 79 (1); 45-50.
7. Europa press 2018. *Un nuevo tratamiento para el glaucoma podría aliviar los síntomas mientras duermes*. www.infosalus.com
8. Europa press 2018. *Desarrollan unas gotas oculares que podrían aliviar los síntomas del glaucoma durante el sueño*. www.jano.es

9. Swatantra KS Kushwaha, Prachi Saxena y AK Rai. *Stimuli sensitive for ophtalmic drug delivery: A review*. International Journal os Pharmaceutical Investigation Abril-Junio 2020; 2(2); 54-60.
10. Paula Anfrea Faccia. *Síntesis y caracterización de materiales poliméricos para sistemas de transporte y liberación de fármacos con potenciales aplicaciones en terapias oftalmológicas*. Universidad Nacional de La Plata, 2013.
11. Ana M. Carvalho, Raquel Teixeira, Ramón Novoa-Carballal, Ricardo A. Pires, Rui L. Reis y Iva Pashkuleva. *Redox-Responsive Micellar Nanoparticles from Glycosaminoglycans for CD44 Targeted Drug Delivery*. American Chemical Society Biomacromolecules 2018; 19; 2991-2999
12. Javier Adrián Calles, Ignacio Tártara, Santiago Daniel Palma y Enrique Marcelo Vallés. *El ácido hialurónico y sus aplicaciones oftalmológicas*. Revista Oftalmología clínica y experimental ISSN 1851-2658; 2011; 28-32.
13. Manuel Megias, Pilar Molist, Manuel A. Pombal. *La célula. Ampliaciones I*. Departamento de biología funcional y ciencias de la salud. Facultad de biología. Universidad de Vigo, 2017.
14. Laura Vivero Sanchez. *“Diseño y caracterización de sistemas de liberación de fármacos basados en nanopartículas metálicas y ácido hialurónico”* Departamento de farmacología i química terapéutica Universitat de Barcelona, 2014
15. Sei Kwang Hahn, Juang Kyu Park, Takashi Tomimatsu, Tsuyoshi Shimoboji. *Synthesis and degradation test of hyaluronic acid hidrogels*. International Journal of Biological Macromolecules 40; 2007; 374-380.
16. Protocolo NanoDrop 3300 Fluorescamine Protein Assay Thermo Scientific.
17. Protocolo Ellman's Reagent. Thermo Scientific.



18. Eugene Lih, Seul Gi Choi, Dong June Ahn, Yoon Ki Joung and Dong Keun Han. *Optimal conjugation of catechol group onto hyaluronic acid in coronary stent substrate coating for the prevention of restenosis*. Journal of Tissue Engineering 2016; 7;1-11.

7. ANEXOS.

PLACA				
Di E és serial dilution de ADH (D1 és 100%)				
F1-F4 buffer+fluorescamine				
F5: control 0,5%			Pes (g)	
F6: control 1%		HA-ADH 1%		0,0016
F7: HA-ADH 0,5%		HA-ADH 0,75%		0,0011
F8: control 0,75%		HA-ADH 0,5%		0,0017
F9: HA-ADH 0,75%		HA 1%		0,0015
F10: HA-ADH 1%		HA 0,75%		0,0012
		HA 0,5%		0,0016
Peso ADH(g)	0,0554			0,0004
V (ml)	5			

Imagen 22. Peso y disposición placa fluorescamina (HA-ADH 1%, 0.75% y 0.5%)

Tabla 8. Pesos muestras para la prueba de fluorescamina

MUESTRAS	PES (g)
HA-ADH 1%	0,0016
HA-ADH 0,75%	0,0011
HA-ADH 0,5%	0,0017
HA 1%	0,0015
HA 0,75%	0,0012
HA 0,5%	0,0016
HA-ADH 0,2%_R1	0,0005
HA-ADH 0,2%_R2	0,0003
HA-ADH 0,2%_R3	0,0005
HA 0,2%_R1	0,0006
HA 0,2%_R2	0,0003
HA-ADH 0,1%_R1	0,0011
HA-ADH 0,1%_R2	0,001
HA-ADH 0,1%_R3	0,0012
HA-ADH 0,05%_R1	0,0009
HA-ADH 0,05%_R2	0,001
HA-ADH 0,05%_R3	0,0011
HA 0,1%_R1	0,001
HA 0,1%_R2	0,001
HA 0,1%_R3	0,0011
HA 0,05%_R1	0,0011
HA 0,05%_R2	0,001
HA 0,05%_R3	0,0011

		3 min				3h						3 min				3h			
		[ADH]	Exc 390 nm	Exc 365 nm	Exc 390 nm	Exc 365 nm							Exc 390 nm	Exc 365 nm	Exc 390 nm	Exc 365 nm			
Pes (g)	0,0554	63605,05166	35009	11810	28991	11055			Mostres			Exc 390 nm	Exc 365 nm	Exc 390 nm	Exc 365 nm				
MW (g/mol)	174,2	31802,52583	34640	11698	29055	10997			HA-ADH 1%			41340	13152	42775	15068				
V (l)	0,005	15901,26292	34514	11647	29242	10924			HA-ADH 0,75%			42269	13513	43530	15465				
[ADH] (M)	0,06360505	7950,631458	34046	11451	29247	10894			HA-ADH 0,5 %			43708	13969	42506	14654				
mM	63,6050517	3975,315729	32693	10850	28562	10389			HA 1%			19320	5444	23555	7793				
uM	63605,0517	1987,657865	34229	11138	27716	9528			HA 0,75%			23862	7202	22221	6971				
		993,8289323	31404	9387	26873	8577			HA 0,5%			25143	7942	17308	4954				
		496,9144661	30966	8412	24701	6714													
		248,4572331	26486	5917	21158	4756													
		124,2286165	22611	4333	17720	3397													
		62,11430827	20850	3629	14970	2533													
Concentraci3n ADH		31,05715413	18018	2584	13426	2006													
		15,52857707	16950	2325	12587	1761													
		7,764288533	16941	2186	13059	1704													
		3,882144267	15893	1889	12667	1631													
		1,941072133	15830	1873	12708	1616													
		0,970536067	15657	1825	12645	1583													
		0,485268033	15311	1835	12720	1588													
		0,242634017	15233	1758	12758	1591			Absorbancia serial diluci3n										
		0,121317008	14622	1634	12628	1576													
		0,060658504	14564	1643	12724	1578													
		0,030329252	15249	1835	12144	1532													
		0,015164626	14847	1702	12053	1512													
		0,007582313	15859	1957	11676	1479													
		0	15965,7453	1830,00848	13284,1078	1616,39232			Media absorbancias muestra control										

Imagen 23. Resultados prueba recta de calibrado fluorecamina.

		3 min		3h	
Muestras		Exc 390 nm	Exc 365 nm	Exc 390 nm	Exc 365 nm
HA-ADH 1%		41340	13152	42775	15068
HA-ADH 0,75%		42269	13513	43530	15465
HA-ADH 0,5 %		43708	13969	42506	14654
HA 1%		19320	5444	23555	7793
HA 0,75%		23862	7202	22221	6971
HA 0,5%		25143	7942	17308	4954
HA-ADH 0,2%_R1		23275	13736		
HA-ADH 0,2%_R2		24077	14339		
HA-ADH 0,2%_R3		23685	13858		
HA 0,2%_R1		10980	5533		
HA 0,2%_R2		13141	7146		
HA-ADH 0,1%_R1		37328	10379		
HA-ADH 0,1%_R2		35145	9465		
HA-ADH 0,1%_R3		37609	10605		
HA-ADH 0,05%_R1		41886	8348		
HA-ADH 0,05%_R2		44405	9831		
HA-ADH 0,05%_R3		39677	9899		
HA 0,1%_R1		14549	3278		
HA 0,1%_R2		16360	4120		
HA 0,1%_R3		19944	5149		
HA 0,05%_R1		11130	2099		
HA 0,05%_R2		11347	2027		
HA 0,05%_R3		11926	2536		

Imagen 24. Absorbancia totalidad muestras para fluorecamina.

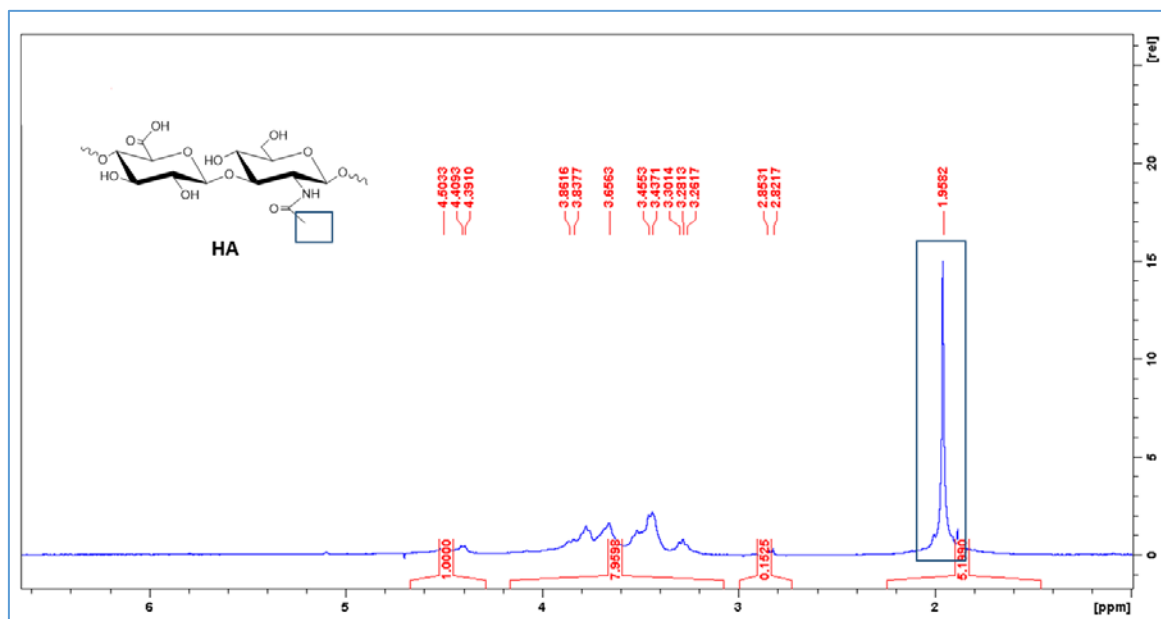


Imagen 25. Espectro RMN del HA

2	A1 100% L-cysteine					
3	A1-B12 Serial dilution					
4	C1 HA-SH 1% R1		R1 Peso (g)	R2 Peso (g)	R3 Peso (g)	
5	C2 HA-SH 1% R2	HA-SH 1%	0,0015	0.0017	0.0016	
6	C3 HA-SH 1% R3	HA-SH 0,75%	0.0012	0.0012	0.0010	
7	C4 HA-SH 0,75% R1	HA-SH 0,5%	0.0013	0.0017	0.0015	
8	C5 HA-SH 0,75% R2	HA 1%	0.0017			
9	C6 HA-SH 0,75% R3	HA 0.75%	0.0011			
10	C7 HA-SH 0,50% R1	HA 0.5%	0.0014			
11	C8 HA-SH 0,50% R2					
12	C9 HA-SH 0,50% R3					
13	C10 HA 1%					
14	C11 HA 0,75%					
15	C12 HA 0,5%					
16	D1 Control					
17	D2 Control					
18	D3 Control					

Imagen 26. Pesos y distribución placa para Ellman.

Recta de calibrado									
	(μM)	30 min							
		[L-cysteine]	Abs 412 nm	Abs 450 nm					
Pes (g)	0,1232	101683,724	OVER	OVER					
Mw (g/mol)	121,16	50841,862	OVER	OVER					
volume(ml)	10	25420,931	OVER	OVER					
conc (M)	0,10168372	12710,4655	OVER	OVER					
		6355,23275	OVER	OVER					
		3177,61638	OVER	OVER					
		1588,80819	OVER	2,5108					
		794,404094	2,7928	1,5866					
		397,202047	1,4113	0,7814					
		198,601023	0,7137	0,3903					
		99,3005117	0,4012	0,2151					
		49,6502559	0,238	0,1234					
		24,8251279	0,1566	0,0698					
		12,412564	0,1236	0,0591					
		6,20628198	0,1065	0,0495					
		3,10314099	0,0986	0,0449					
		1,5515705	0,0921	0,0421					
		0,77578525	0,0908	0,0408					
		0,38789262	0,0911	0,0413					
		0,19394631	0,0882	0,0394					
		0,09697316	0,0867	0,0383					
		0,04848658	0,0856	0,0382					
		0,02424329	0,0839	0,0377					
		0,01212164	0,0863	0,0385					
		0	0,08706604	0,03889838					

Substitución en la recta

Aplicación fórmula
Resta HA-SH y HA

Imagen 27. Resultados Ellman.

A1-B12 Serial dilution			
D1-D3 Control		R1 Peso (g)	R2 Peso (g)
D4 HA-DOP 0,1 R1		HA-DOP 0,1	0,0028
D5 HA-DOP 0,1 R2		HA-DOP 0,05	0,0019
D6 HA-DOP 0,05 R1		HA 0,1	0,003
D7 HA-DOP 0,05 R2		HA 0,05	0,0022
D8 HA 0,1 R1			
D9 HA 0,1 R2			
D10 HA 0,05 R1			
D11 HA 0,05 R2			

Imagen 28. Pesos y distribución placa para Folin.

		15 min				1h				Valor resultante de restar HA a HA-DOP							
		Exc 765 nm		Exc 700 nm		Exc 765 nm		Exc 700 nm									
0,012																	
170,12	[DOP]									15 min		1h					
0,001		0,0459	0,0476	0,0446	0,0462	Mostres		Exc 765 nm	Exc 700 nm	Exc 765 nm	Exc 700 nm						
0,07053844	35269,2218	1,9082003	2,16630006	1,81420004	2,02719998	HA-DOP 0,5%, F	0,91219997	0,95179999	0,90189999	0,94309998	0,18709999	0,21520001	0,20050001	0,22799999			
70,5384435	17634,6109	1,94210005	2,1710999	1,69480002	1,87039995	HA-DOP 0,5%, F	1,00199997	1,04560006	0,98989999	1,04110003	0,2155	0,24410003	0,22939998	0,26340002			
70538,4435	8817,30544	1,53190005	1,68799996	1,44939995	1,57690001	HA-DOP 0,75%, I	1,02419996	1,07130003	1,01030004	1,06400001	0,55169997	0,59580004	0,55840003	0,60840002			
	4408,65272	0,87410003	0,93720001	0,84899998	0,90530002	HA-DOP 0,75%, I	0,76749998	0,80220002	0,75139999	0,79110003	-0,03250003	-0,03689998	-0,02399999	-0,01479995			
	2204,32636	0,4472	0,463	0,4436	0,4585	HA 0,5%, R1	0,72509998	0,73659998	0,70139998	0,71509999							
	1102,16318	0,2446	0,2448	0,2499	0,252	HA 0,5%, R2	0,78649998	0,80150002	0,76050001	0,77770001							
	551,08159	0,19320001	0,1904	0,2018	0,2008	HA 0,75%, R1	0,4725	0,47549999	0,45190001	0,45599999							
	275,540795	0,1389	0,1346	0,14579999	0,1441	HA 0,75%, R2	0,80000001	0,8391	0,77539998	0,80589998							
	137,770397	0,1081	0,1009	0,1134	0,1083					MEDIA	0,28123843	0,31514001	0,29504238	0,33182819			
	68,8851987	0,0951	0,0873	0,1016	0,0947						28,1238431	31,5140014	29,5042381	33,1828191			
	34,4425994	0,0906	0,082	0,0947	0,0881							30,5206638					
	17,2212997	0,0825	0,074	0,0876	0,0806												
	8,61064984	0,082	0,0739	0,087	0,0802												
	4,30532492	0,0809	0,0732	0,0909	0,0827												
	2,15266246	0,0789	0,0703	0,083	0,0765												
	1,07633123	0,0776	0,0687	0,0825	0,0754												
	0,53816562	0,0801	0,0717	0,0852	0,0783												
	0,26908281	0,0818	0,0712	0,0843	0,0759												
	0,1345414	0,0767	0,0684	0,0813	0,0732												
	0,0672707	0,0774	0,0685	0,0828	0,0759												
	0,03363535	0,0755	0,067	0,083	0,0738												
	0,01681768	0,0791	0,0696	0,0854	0,0769												
	0,00840884	0,0786	0,0702	0,0817	0,0756												
	0	0,08043315	0,07223138	0,08279531	0,07619772												

Imagen 31. Resultados numéricos fluorescencia DTT y pH (2 días).

Imagen 32. Resultados numéricos fluorescencia temperatura.



Imagen 33. Fluoresceína en PBS y DTT.